

Aus der Klinik für Innere Medizin - Schwerpunkt Kardiologie
(Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. Bernhard Schieffer)
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

in Zusammenarbeit mit dem Universitätsklinikum
Gießen und Marburg GmbH, Standort Marburg

Die Rolle der aminoterminalen Coiled-coil-Domäne von STAT1 in der Interferonantwort



Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Humanmedizin

dem Fachbereich Medizin
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Benjamin Ziegler
aus Ratingen

Mannheim, 2014

Angenommen vom Fachbereich Medizin
der Philipps-Universität Marburg am 01.07.2014

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan:	Prof. Dr. H. Schäfer
Referent:	Prof. Dr. mult. T. Meyer
1. Korreferent:	Prof. Dr. G. Suske

Zusammenfassung

Das Existieren von Signalwegen innerhalb einer Zelle sowie zwischen verschiedenen Zellen ist unabdingbar für das Überleben aller mehrzelliger Organismen. Sie ermöglichen eine suffiziente Adaptation jeder einzelnen Zelle an wechselnde äußere Bedingungen. In der Literatur sind eine Vielzahl unterschiedlicher Mechanismen beschrieben, die eine Zelle dazu befähigen, extrazelluläre Signale in das Innere der Zelle zu leiten.

Ein in den letzten Jahren intensiv untersuchter Signalübertragungsmechanismus ist der sogenannte JAK-STAT-Signalweg. Dieser Signalweg ermöglicht einer Zelle, extrazelluläre Informationen zu erkennen und bis in ihren Kern fortzuleiten. Zunächst erkennen zellmembranständige Rezeptoren extrazelluläre Signale in Form von Zytokinen wie Interleukine und Interferone. Diese aktivieren an den Rezeptor gebundene, intrazelluläre Januskinasen (JAK). Im nächsten Schritt katalysieren die JAKs die Tyrosin-Phosphorylierung der STAT-Proteine (Signal Transducers and Activators of Transcription), welche anschließend dimerisieren. Die dimerisierten STAT-Moleküle erkennen spezifische Promotorregionen ihrer Zielgene und bewirken schließlich eine Modifikation der Transkription der entsprechenden Gene.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Bedeutung konservierter Aminosäurereste in der aminoterminalen Coiled-coil-Domäne des STAT1-Proteins untersucht. Dazu wurden Punktmutationen als Alanin-Scans an den Stellen 136, 137, 138, 139 und 143 sowie eine doppelte Punktmutation 136/137 mittels Mutagenese in ein STAT1-kodierendes Plasmid eingeführt. Auf diese Weise konnten mutierte STAT1-Proteine gewonnen werden, die mithilfe von Fluoreszenzmikroskopie, Western-Blot-, Reporteragen-, Gel-Shift- und RT-PCR-Versuchen charakterisiert wurden.

Die Ergebnisse der durchgeführten Versuche zeigten keine signifikanten Unterschiede im Vergleich der untersuchten Mutanten mit dem Wildtyp. Dies

legt nahe, dass ein Austausch der beschriebenen Aminosäuren in der Coiled-coil-Domäne die funktionelle Integrität von STAT1 bei der Interferonantwort nicht eingeschränkt.

Die im Rahmen dieser Arbeit festgestellten Ergebnisse werden durch Arbeiten anderer Autoren bestätigt (Mertens et al., 2006). Sie konnten unter anderem zeigen, dass die konkrete Abfolge der Aminosäuren dieser Sequenz nicht von entscheidender Bedeutung ist und auch ein umfangreicher Austausch von Aminosäuren die regelrechte Signaltransduktion nicht beeinträchtigt. Eine starke Kürzung der Sequenz führt jedoch in entsprechenden Experimenten zu einer persistierenden Phosphorylierung von STAT1. Es ist daher anzunehmen, dass die funktional intakte Coiled-coil-Domäne notwendige Voraussetzung für die Umlagerung der Konformation von phosphorylierten STAT1-Dimeren ist. Diese Konformationsänderung ist erforderlich, um das phosphorylierte STAT1 einer Dephosphorylierung und damit der Beendigung der Signalübertragung zugänglich zu machen. Für die Funktion des Proteins scheint daher die Coiled-coil-Domäne mit ihren Eigenschaften als ausreichend lange und flexible Kette von Aminosäuren von großer Bedeutung zu sein. Einzelne Aminosäuren können in dieser Kette aber ohne Folgen ausgetauscht werden.

Summary

Signal transductions within the cell as well as between different cells are indispensable for the existence of multi-cellular organisms as they allow a sufficient adaptation of each cell to changing environmental conditions. A variety of mechanisms that enable the cell to transmit extracellular signals into the cells are described in literature. One of these extensively investigated pathways is the JAK-STAT signal transduction. It enables the cell to detect extracellular information and to transduce them into transcriptional responses. First, receptors in the cell membrane recognize extracellular signals like interleukins or interferons. These receptors activate receptor-bound janus kinases (JAKs) in the cytoplasm by tyrosine phosphorylation. The JAKs phosphorylate proteins from the family of signal transducers and activators of transcription (STATs). The phosphorylated STAT proteins dimerize and bind to specific promoter regions in cytokine-driven target genes and modify their transcription.

In this PhD thesis, I investigated the role of conserved amino acid residues in the amino-terminal coiled-coil domain of STAT1 in interferon signaling. For this purpose several point mutations at positions 136, 137, 138, 139 and 143 as well as a double mutation at position 136/137 were introduced into a STAT1-coding plasmid by site-directed mutagenesis. The resulting mutants were expressed in HeLa cells and STAT1-negative U3A cells and characterized by means of fluorescence microscopy, western blotting, gel shift assays and transcriptional assays.

The results of these experiments showed no significant difference between the tested mutants and the wild type protein. Thus, the exchange of the above-mentioned amino acids in the amino-terminal coiled-coil domain of STAT1 does not restrict the functional integrity of STAT1 in interferon signal transduction.

These findings were also confirmed by the work of other authors demonstrating that the precise order of amino acid residues in this sequence is not of critical importance (Mertens et al., 2006). Even an extensive exchange of amino acid residues in the coiled-coil domain does not affect signal propagation by STAT1. In contrast, truncation of the sequence is leading to a persistent phosphorylation of STAT1. Hence, it can be assumed that the functional intact coiled-coil domain is required for a shift between two configurations of phosphorylated STAT1 dimer, which makes the anti-parallel dimer conformation accessible for dephosphorylation. For this function, the coiled-coil domain has to be of sufficient length and flexibility. The exchange of single amino acids, however, seems to be without any effects on the amplitude and duration of interferon signals.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	III
Summary.....	V
Inhaltsverzeichnis.....	VII
Abbildungsverzeichnis.....	IX
Tabellenverzeichnis.....	XI
1 Abkürzungen und Fachbegriffe.....	1
2 Einleitung.....	5
2.1 Interferone als Mediatoren der STAT1-vermittelten.....	
Signaltransduktion.....	5
2.2 Struktur und Funktion von STAT1.....	8
2.3 Zielsetzung dieser Arbeit.....	12
3 Material.....	14
3.1 Chemikalien.....	14
3.2 Radiochemikalien.....	14
3.3 Verbrauchsmaterialien.....	14
3.4 Antikörper.....	15
3.5 Enzyme und Inhibitoren.....	15
3.6 Reaktionskits.....	16
3.7 Bakterien und Medien.....	16
3.8 Zelllinien und Medien.....	17
3.9 Plasmide.....	20
4 Methoden.....	22
4.1 Einführung von Punktmutationen in Plasmide.....	22
4.2 Transformation von Plasmid-DNA in kompetente Bakterien.....	23
4.3 Gewinnung von Plasmid-DNA aus Bakterien.....	23
4.4 Sequenzierung von DNA.....	24
4.5 Konzentrationsbestimmung von DNA.....	24
4.6 Transfektion von Säugerzellen.....	25
4.7 Zellextraktion	25
4.8 SDS-Gelelektrophorese.....	26

4.9	Western-Blotting.....	27
4.10	EMSA.....	29
4.11	Fluoreszenzmikroskopische Präparate.....	30
4.12	Immunzytochemische Präparate.....	31
4.13	Reportergen-Assays.....	31
4.14	RNA-Isolation	33
4.15	cDNA-Synthese.....	33
4.16	Real-Time-PCR.....	34
4.17	Darstellung der STAT1-Struktur.....	34
5	Ergebnisse.....	35
5.1	Durch Mutagenese in das STAT1-Protein eingeführte Mutationen..	35
5.2	Intrazelluläre Verteilung von GFP-markiertem STAT1 in der..... Fluoreszenzmikroskopie.....	36
5.3	Immunzytochemische Analyse der Kinetik der Kernakkumulation..... von STAT1-Proteinen.....	40
5.4	Phosphorylierungsassays.....	43
5.5	EMSA-Experimente.....	45
5.6	Reportergen-Assays.....	51
5.7	Realtime-PCR-Analysen	55
6	Diskussion.....	58
7	Literaturverzeichnis.....	70
	Verzeichnis akademischer Lehrer.....	80
	Danksagung.....	83

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Dreidimensionales Modell der funktionellen Domänen eines STAT1-Dimers.....	11
Abb. 2: Darstellung der eingeführten Mutationen anhand eines STAT1-Dimers	35
Abb. 3: Die STAT1-Mutanten L136A und D137A unterscheiden sich in ihrer Kernakkumulation nicht von dem Wildtyp.....	36
Abb. 4: Die Mutanten K138A und Q139A zeigen die gleiche intrazelluläre Verteilung wie der Wildtyp.....	37
Abb. 5: Die intrazelluläre Umverteilung der Mutanten D143A und L136A/D137A nach Interferonstimulation entspricht der des Wildtyps.....	38
Abb. 6: Die STAT1-Mutanten L136A und D137A unterscheiden sich in der immunzytochemischen Analyse ihrer Kernakkumulation nicht vom Wildtyp.....	40
Abb. 7: Die Kinetik der intrazellulären Verteilung der Mutanten K138A und Q139A unterscheidet sich in der immunzytochemischen Untersuchung nicht vom Wildtyp.....	41
Abb. 8: Immunzytochemisch lässt sich kein Unterschied in der Kernakkumulation der Mutanten D143A und L136A/D137A und der des Wildtyps feststellen.....	42
Abb. 9: Das Phosphorylierungsniveau der untersuchten STAT1-Mutanten unterscheidet sich nicht von dem des Wildtyps.....	44
Abb. 10: Die Mutanten L136A und D137A zeigen eine mit dem Wildtyp vergleichbare DNA-Bindeaffinität.....	46
Abb. 11: Die Fähigkeit zur DNA-Bindung der Mutanten K138A und Q139A gleicht der des Wildtyps.....	47
Abb. 12: Die Mutanten D143A und L136A/D137A weisen eine erhaltene, spezifische DNA-Bindeaffinität auf.....	48
Abb. 13: Die Stabilität der DNA-Bindung durch die Mutanten L136A, D137A, K138A, Q139A und D143A ist erhalten.....	50

Abb. 14: Die Mutante L136A/D137A zeigt eine mit dem Wildtyp übereinstimmende Stabilität der DNA-Bindung.....	51
Abb. 15: WT und Mutanten stimulieren die Expression an den Promotor Ly6E gekoppelter Reportergene ohne signifikanten Unterschied.....	52
Abb. 16: Der pIC-339-gekoppelte Luciferasereporter wird durch WT und Mutanten gleichermaßen induziert.....	53
Abb. 17: Ein Vergleich mit dem Promotor pIC-1352 bestätigt das bisherige Ergebnis.....	54
Abb. 18: STAT1-Wildtyp und Mutanten führen zu einer IFN γ -abhängigen Expression des STAT1-Zielgenes <i>gbp1</i>	55
Abb. 19: Nach IFN γ -Stimulation induzieren STAT1-Wildtyp und die untersuchten Mutanten die Expression des Zielgenes <i>irf1</i>	56
Abb. 20: Die untersuchten STAT1-Mutanten zeigen eine dem Wildtyp gleiche oder sogar gesteigerte Induktion des STAT1-Zielgenes <i>mig1</i> nach IFN γ -Stimulation.....	57
Abb. 21: Zytokin-vermittelter Kernimport und -export von STAT1.....	61

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Proteinogene Aminosäuren.....	4
Tab. 2: Verwendete Antikörper.....	15
Tab. 3: Verwendete Enzyme und Inhibitoren.....	15
Tab. 4: Verwendete Reaktionskits.....	16
Tab. 5: Verwendete Zelllinien.....	17
Tab. 6: Primer für Sequenz-spezifische Mutagenese.....	18
Tab. 7: Primer zur Sequenzierung.....	19
Tab. 8: Oligonukleotide für Gelshift-Analysen.....	19
Tab. 9: Primer für Real-time-PCR.....	19
Tab. 10: Verwendete Plasmide.....	21
Tab. 11: Cyclor-Programm für Mutagenese.....	22
Tab. 12: Transfektionsreagenz für verschiedene Zellkulturplatten.....	25
Tab. 13: Programm der Realtime-PCR.....	34

1 Abkürzungen und Fachbegriffe

° C	Grad Celsius
μ	mikro
A	Absorption, Ampère
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
bp	Basenpaare
c	Konzentration, centi
CCD	Coiled-coil Domäne
cDNA	komplementäre DNA
CRM	Chromosome Region Maintenance
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
DBD	DNA-Bindedomäne
CSF	Kolonie-stimulierende Faktoren
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DMEM	Dulbeccos modifiziertes Eagle-Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotid
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-Tetraessigsäure
EMSA	Elektrophoretischer Mobilitäts-Shiftassay
EtOH	Ethanol
FBS	fötales Rinderserum
g	Erdbeschleunigung
GAS	Gamma-activated Sequence
GFP	Grün-fluoreszierendes Protein
h	Stunde(n)
Hepes	N-(2-hydroxyethyl)-1-Piperazino-Ethansulfonsäure
HCl	Salzsäure

ICAM-1	Intrazelluläres-Adhäsions-Molekül-1
IFN	Interferon
IFNAR	Interferon- α/β -Rezeptor
IFNGR	Interferon- γ -Rezeptor
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IRF	Interferon-regulatory Factor
ISGF	Interferon-stimulated Gene Factor
ISRE	Interferon-stimulated Response Element
JAK	Janus-Kinase
k	Kilo
KCl	Kaliumchlorid
l	Liter
LB	Luria-Broth
LD	Linkerdomäne
LMB	Leptomycin B
m	milli
M	molar
MeOH	Methanol
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
MHC	Major-Histocompatibilitäts-Complex
Min.	Minute(n)
mRNA	Messenger-RNA
n	nano
NaCl	Natriumchlorid
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
NaOH	Natriumhydroxid
Na ₃ VO ₄	Natrium-ortho-Vanadat
ND	Aminoterminal Domäne
NES	nukleäres Exportsignal

NLS	nukleäres Lokalisationssignal
OD	optische Dichte
ONPG	ortho-Nitrophenyl- β -D-Galactopyranosid
p	pico
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PBS-T	Phosphat-gepufferte Salzlösung + 0,1% Tween20
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PIAS	Protein Inhibitor of activated STAT
RNA	Ribonukleinsäure
PVDF	Polyvinylidenfluorid
Upm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur, Reverse Transkriptase
SDS	Natriumlaurylsulfat
Sek.	Sekunde
SH2	Src-Homologie 2
SOCS	Suppressors of Cytokine Signaling
STAT	Signal Transduktor und Aktivator der Transkription
TAD	Transaktivierungsdomäne
TBE	Tris-Borsäure-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TNF	Tumornekrosefaktor
Tris	2-Amino-2-Hydroxymethyl-1,3-Propandiol
U	Units
UV	Ultraviolett
V	Volt
WT	Wildtyp

Aminosäure	Einbuchstabencode	Dreibuchstaben- code
Alanin	A	Ala
Arginin	R	Arg
Asparagin	N	Asn
Aspartat	D	Asp
Cystein	C	Cys
Glutamat	E	Glu
Glutamin	Q	Gln
Glycin	G	Gly
Histidin	H	His
Isoleucin	I	Ile
Leucin	L	Leu
Lysin	K	Lys
Methionin	M	Met
Phenylalanin	F	Phe
Prolin	P	Pro
Serin	S	Ser
Threonin	T	Thr
Tryptophan	W	Trp
Tyrosin	Y	Tyr
Valin	V	Val

Tab. 1: Proteinogene Aminosäuren

2 Einleitung

2.1 Interferone als Mediatoren der STAT1-vermittelten Signaltransduktion

Mehrzellige Organismen sind auf eine effektive Kommunikation zwischen unterschiedlichen Zellen angewiesen. Sie ermöglicht es, dass die Zellen in Kooperation miteinander komplexe Vorgänge bewältigen und sich auf immer neue äußere Bedingungen einstellen können. Zytokine spielen dabei für diese Kommunikation der Zellen untereinander eine entscheidende Rolle.

Der Begriff Zytokine beschreibt eine Gruppe hormonähnlicher Mediatoren. Sie sind an der Steuerung der Ontogenese, den Entzündungs- und Immunreaktionen, der Apoptose und der Aufrechterhaltung vieler weiterer Körperfunktionen beteiligt. Im Gegensatz zu Hormonen können sie von verschiedenen Zellen auf einen bestimmten Stimulationsreiz hin sezerniert werden und wirken meist parakrin oder autokrin auf spezifische Zytokinrezeptoren. Sie haben ein niedriges Molekulargewicht (<80 kDa) und sind äußerst potent, sodass bereits kleinste Konzentrationen Reaktionen von unterschiedlicher Stärke und Dauer hervorrufen können (Balkwill und Burke, 1989). Zu ihrer Klassifikation stehen verschiedene Systeme zur Verfügung, welche die Zytokine nach ihrer Funktion, ihrer strukturellen Beschaffenheit oder den zugehörigen Zytokinrezeptoren einteilen (Loppnow, 2001). Nach ihrer wesentlichen Funktion unterscheidet man die Gruppen der Interleukine (IL), der Tumornekrosefaktoren (TNF), der Kolonie-stimulierenden Faktoren (CSF) sowie der Interferone (IFN). Die Interleukine dienen vorwiegend der Modulation des Immunsystems, indem sie die Ausschüttung weiterer Mediatoren sowie die Proliferation von Zellen veranlassen. Tumornekrosefaktoren sind an Entzündungsreaktionen beteiligt und werden vorwiegend durch Makrophagen ausgeschüttet. Sie können zu Apoptose, aber auch zu Proliferation und Ausschüttung anderer Zytokine führen. Kolonie-stimulierende Faktoren überneh-

men vor allem Funktionen in der Hämatopoese und regulieren die Differenzierung und Proliferation der Stammzellen (Coze, 1994).

Die Zytokine der Gruppe der Interferone modulieren ebenfalls das Immunsystem. 1957 wurden erstmals Faktoren entdeckt, die von Virus-infizierten Zellen sezerniert wurden und andere Zellen in einen Virus-resistenten Zustand versetzten. Aufgrund dieser, mit der Virus-Replikation interferierenden Wirkung nannten die Erstbeschreiber diese Faktoren „Interferone“ (Isaacs und Lindenmann, 1957). Heute werden die Interferone in zwei Klassen eingeteilt. Die Typ-I-Klasse umfasst die sieben Interferone IFN- α , IFN- β , IFN- ϵ , IFN- κ , IFN- ω , IFN- δ und IFN- τ . Allerdings ist nur für die Interferone IFN- α , IFN- β , IFN- ϵ , IFN- κ und IFN- ω ein Vorkommen im menschlichen Organismus beschrieben. Die Typ-II-Interferonklasse besteht dagegen nur aus IFN- γ . Zusätzlich sind vier weitere Zytokine Limitin, IL-28A, IL-28B und IL-29 als Interferon-ähnliche Zytokine beschrieben, wobei Limitin bislang nur in Mäusen nachgewiesen werden konnte (Pestka et al., 2004).

Typ-I-Interferone können von den meisten Zellen als Antwort des Immunsystems auf eine Exposition mit Viren, Viruspartikeln oder doppelsträngiger RNA sezerniert werden. Sie binden an einen gemeinsamen Rezeptor (IFN- α/β -Rezeptor), der aus den zwei Untereinheiten IFN- α -Rezeptor 1 (IFNAR1) und IFN- α -Rezeptor 2 (IFNAR2) besteht. Im Gegensatz dazu wird IFN- γ ausschließlich von spezialisierten Zellen des Immunsystems wie den natürlichen Killerzellen (NK), T-Helferzellen Typ-I sowie den zytotoxischen T-Zellen als Antwort auf mitogene bzw. antigene Stimuli produziert. Dieses Interferon bindet an den IFN- γ -Rezeptor, der aus jeweils einer Untereinheit des IFN- γ -Rezeptors 1 (IFNGR1) und des IFN- γ -Rezeptors 2 (IFNGR2) besteht (Bach et al., 1997; Schroder et al., 2004).

Durch Versuche mit Knock-out-Mäusen konnte gezeigt werden, dass sowohl der IFN- α/β -Rezeptor als auch der IFN- γ -Rezeptor essentielle Funktionen bei der Abwehr von viralen Infektionen übernimmt. Beide Rezeptoren bewirken im aktivierten Zustand über den JAK-STAT-Signalweg eine Anpassung der Genexpression von Proteinen, die zur Infektionsabwehr dienen. Im Falle der

Typ-I-Interferone geschieht dies über so genannte interferon-stimulated response elements (ISRE) in der Promotorregion, während durch IFN- γ vorrangig Gene mit gamma-activated sequence (GAS-Promotor) induziert werden (Oritani et al., 2001). Die antivirale Wirkung der Interferone beruht auf der Induktion einer Reihe von Proteinen, die in der Lage sind, virale RNA zu erkennen, virales Erbgut zu zerstören oder die Replikation von viralen Polypeptiden zu verhindern. Zu diesen Proteinen zählt die Protein-Kinase PKR, die abhängig vom Vorhandensein viraler DNA weitere Proteine phosphoryliert, welche die Translation von mRNA verhindern (Clemens und Elia, 1997). Außerdem wird 2'-5'-Oligoadenylat-Synthetase induziert, die durch produzierte Oligoadenylat-Fragmente die RNase L aktivieren, die wiederum zytosolische RNA zerstört (Rebouillat und Hovanessian, 1999). Beide Mechanismen führen zu einer Beeinträchtigung der Replikation viraler Proteine. Außerdem wird durch Expression der GTPase Mx zytosolisches GTP in GDP umgewandelt, was die Transkription viraler RNA behindert. Darüber hinaus erhöht die Stimulation mit Interferonen die Expression von Bestandteilen des Major-Histocompatibilitäts-Complexes (MHC) auf Zellen, hemmt Zellen in ihrem Wachstum und sensibilisiert sie gegenüber apoptotischen Reizen (Samuel, 2001).

Interferone sind zudem an der Kontrolle von malignen Tumoren beteiligt (Kaplan et al., 1998). IFN- γ ist durch antiproliferative und proapoptische Eigenschaften in der Lage, Tumorstadium sowie Angiogenese zu unterdrücken. Außerdem vermittelt es die Antwort des angeborenen wie des adaptiven Immunsystems auf den Tumor (Ikeda et al. 2002). Aufgrund ihrer breiten immunmodulatorischen Eigenschaften werden rekombinant hergestellte Interferone mittlerweile zur Therapie verschiedenster Krankheiten eingesetzt. Zu diesen zählen unter anderem die chronische virale Hepatitis, Multiple Sklerose sowie einige Tumorerkrankungen (Miller et al., 2009).

2.2 Struktur und Funktion von STAT1

Um extrazelluläre Signale mit transkriptionellen Antworten zu verknüpfen, benötigen eukaryotische Zellen Signalwege, die Informationen von der Zelloberfläche in den Zellkern übertragen. Dabei reagieren die Zellen mitunter auf eine Vielzahl unterschiedlicher Zytokine jeweils mit einer spezifischen Antwort. Dies geschieht unter anderem mit Hilfe des Jak-STAT-Signalweges, der erstmals bei der Erforschung der Signaltransduktion von Interferonen entdeckt wurde (Darnell et al., 1994).

Von großer Bedeutung für diesen Signalweg sind Proteine, die sowohl das Signal in den Zellkern leiten als auch dort direkt die Transkription bestimmter Gene induzieren. Aufgrund dieser doppelten Funktion werden sie als „Signal-Transduktoren und Aktivatoren der Transkription“ (STAT) charakterisiert. Die Familie der STAT-Proteine umfasst beim Menschen bislang sieben identifizierte Mitglieder (STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5a, STAT5b, STAT6). Die kodierenden Gene für STAT1 und 4 liegen auf dem menschlichen Chromosom 2 (Bande q12 bis q33), Gene für STAT3, 5a und 5b auf Chromosom 12 (q13 bis q14-1) und für STAT2 und 6 auf Chromosom 17 (q11-1 bis q22) (Darnell, 1997). Außer bei Säugetieren konnten Abkömmlinge der STAT-Familie bei *Dictyostelium*, *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila*, *Anopheles*, *Xenopus* und *Danio rerio* nachgewiesen werden (Kisseleva et al., 2002).

Alle Mitglieder der STAT-Familie sind zwischen 750 und 850 Aminosäuren lang und weisen sechs strukturell sowie funktionell konservierte Domänen auf. Die aminoterminal Domäne (ND) besteht aus etwa 130 Aminosäuren und formt eine stabile, unabhängig vom restlichen Molekül gefaltete Einheit. Versuche mit trunkiertem STAT1 ohne aminotermiale Domäne zeigten, dass dem trunkierten Protein die Fähigkeit zur kooperativen DNA-Bindung an so genannten Tandem-GAS-Bindestellen fehlt, während DNA-Bindungen an einzelnen GAS-Bindestellen weiterhin möglich sind. Demnach ist die aminoterminal Domäne zwar nicht für die Dimerisierung einzelner STAT-Monomere notwendig, sie nimmt jedoch eine wichtige Rolle in der für kooperative DNA-

Bindungen essentiellen Interaktion zweier phosphorylierter STAT-Homodimere ein (Vinkemeier et al., 1996; Xu et al., 1996). Darüber hinaus bietet die Domäne Möglichkeiten für vielfältige weitere Proteininteraktionen wie Oligomerisierung und Interaktionen mit PIAS-Proteinen (Protein Inhibitors of Activated STAT) und steht im Zusammenhang mit der Regulierung des Kernimports (Strehlow und Schindler, 1998; Shuai, 2000; Meyer et al., 2004).

Über eine flexible Polypeptidkette mit einer Länge von etwa 20 Aminosäuren schließt sich das so genannte Vier-Helix-Bündel (Coiled-coil-Domäne, CCD) mit einer Länge von etwa 180 Aminosäuren an (Mertens et al., 2006). Diese Region dient mit ihrer großen hydrophilen Oberfläche der Interaktion mit weiteren Proteinen wie dem DNA-Bindeprotein p48 (Horvath et al., 1996), dem Transkriptionsfaktor c-Jun und anderen Proteinen (Kisseleva et al., 2002). Sie enthält darüber hinaus ein nukleäres Export-Signal (NES), welches für den CRM1-abhängigen Export von STAT1 aus dem Zellkern von großer Bedeutung ist (Begitt et al., 2000). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Coiled-coil-Domäne notwendige Funktionen bei der Rezeptorbindung und Tyrosinphosphorylierung von STAT3 übernimmt (Zhang et al., 2000).

Carboxyterminal der Coiled-coil-Domäne liegt die DNA-Bindedomäne (DBD). Diese Domäne besteht aus etwa 170 Aminosäuren und bildet vorwiegend β -Faltblattstrukturen aus. Sie vermittelt die spezifische Erkennung von DNA-Zielsequenzen und die entsprechende DNA-Bindung der STAT-Proteine. Es konnten einzelne Aminosäuren gefunden werden, deren Austausch zum Verlust der Spezifität der DNA-Bindung führt (Brierley und Fish, 2005). Die DNA-Bindedomäne enthält außerdem ein nukleäres Lokalisations-Signal (NLS), welches den nukleären Transport von phosphorylierten STAT1-Dimeren vermittelt (Meyer et al., 2002a) sowie ein weiteres NES, das dephosphoryliertes STAT1 aus dem Nukleus leitet (McBride et al., 2000).

Der DNA-Bindedomäne folgt die Linker-Domäne (LD), die aus ungefähr 90 Aminosäuren besteht und die Verbindung zur SH2-Domäne herstellt. Sie ist vermutlich durch Beeinflussung der Transaktivierungsdomäne essentiell für

die transskriptionelle Aktivität des Moleküls (Yang et al., 1999). Außerdem spielt sie eine Rolle für den Zytokin-unabhängigen Kernimport von STAT-Proteinen (Marg et al., 2004).

Als letzter Teil des STAT-Kernfragments schließt sich die Src-Homology-2-Domäne (SH2-Domäne) an. Sie umfasst etwa 100 Aminosäuren und stellt die am höchsten konservierte Domäne der Protein-Familie dar. Ein β -Faltblatt, flankiert von zwei α -Helices, bildet in der Domäne eine Tasche, in deren Mitte ein konserviertes Arginin (Position 602 bei STAT1) liegt. Mit Hilfe dieses Argininrestes können spezifische phosphorylierte Tyrosine erkannt werden. Dies ist von entscheidender Bedeutung für wesentliche Funktionen der Proteine. Erstens werden mit Hilfe dieser Tasche Phosphotyrosine an aktivierten Zytokinrezeptoren lokalisiert und reversibel gebunden (Greenlund et al., 1995). Zweitens ist die Bindung von Janus-Kinasen an STAT-Proteine zur Phosphorylierung derselben abhängig von der Erkennung von Phosphotyrosinen (Barahmand-Pour et al., 1998). Drittens setzt auch die Bildung von STAT-Homo- und Heterodimeren diese Arginin-Phosphotyrosin-Interaktion voraus (Gupta et al., 1996). Dabei interagiert das Arginin-602 in der Tasche der SH2-Domäne des einen Monomers mit dem carboxyterminal gelegenen Tyrosin-701 eines zweiten Monomers und erlaubt so eine Dimerisierung. Voraussetzung hierfür ist die nach entsprechender Zytokinstimulation stattfindende Phosphorylierung des Tyrosinrestes (Shuai et al., 1993).

Als carboxyterminaler Abschluss fügt sich die Transaktivierungsdomäne (TAD) an. Sie ist die am schwächsten konservierte Domäne der STAT-Proteine, was mit einer unterschiedlich starken transkriptionalen Aktivität der einzelnen Mitglieder der STAT-Familie einhergeht (Shen und Darnell, 2001). STAT1, dem die Transaktivierungsdomäne durch alternatives Splicing fehlt, wird STAT1 β genannt. In vitro ist es trotz fehlender TAD in der Lage, aktiviert zu werden und an spezifischen DNA-Sequenzen zu binden, eine Aktivierung der Transkription von Zielgenen ist jedoch nicht möglich (Zakharova et al., 2003). Die Transaktivierungsdomäne beherbergt außerdem das bereits erwähnte Tyrosin-701, welches durch Phosphorylierung durch Janus-Kina-

sen die Aktivierung des STAT-Proteins vermittelt (Chatterjee-Kishore et al., 2000). Die benachbarten Aminosäuren 702-708 sind ebenfalls an der spezifischen Bindung dieses Tyrosinrestes durch die SH2-Domäne eines weiteren STAT-Proteins beteiligt (Chen et al., 1998). Des Weiteren moduliert die Transaktivierungsdomäne die transkriptionelle Aktivität abhängig von der Phosphorylierung eines Serinrestes an Position 727 von STAT1 (Decker und Kovarik, 2000). Dabei ließ sich feststellen, dass durch eine Phosphorylierung des Serinrestes die Transkription von einigen, nicht jedoch von allen Zielgenen erhöht wird (Kovarik et al., 2001). Abb. 1 zeigt eine räumliche Struktur der einzelnen Domänen von STAT1.

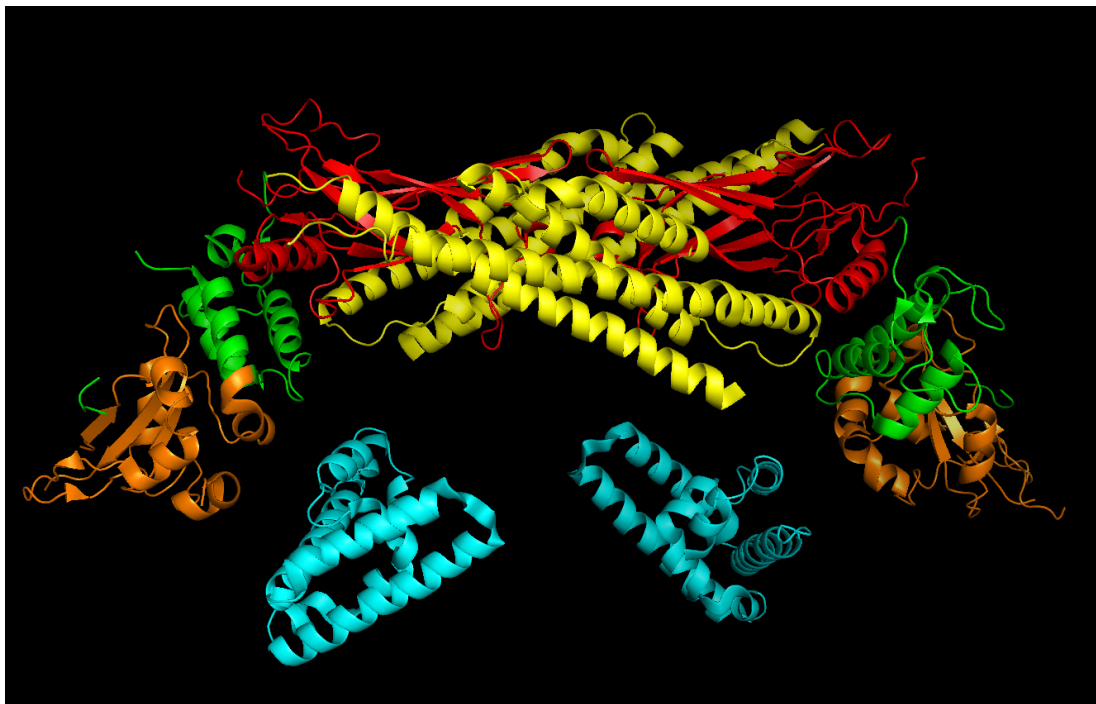


Abb. 1: Dreidimensionales Modell der funktionellen Domänen eines STAT1-Dimers

Farbkodierung: hellblau: aminoterminaler Domäne (ND); gelb: Coiled-coil-Domäne (CCD); rot: DNA-Bindedomäne; grün: Linker-Domäne (LD); orange: Src-Homology-2-Domäne (SH2)

STAT-Proteine können als Monomere vorliegen und sind zudem in der Lage Dimere zu bilden. Hierbei setzen sich Homodimere aus zwei identischen STAT-Proteinen, beispielsweise zwei STAT1-Proteinen, zusammen, Heterodimere aus zwei verschiedenen STAT-Proteinen, wie einem STAT1- und einem

STAT2-Monomer. Für STAT-Dimere ließen sich zwei unterschiedliche Konformationen nachweisen, die sich in der Anordnung der Monomere zueinander sowie anhand der zur dimeren Bindung genutzten Proteinbindestellen unterscheiden und als parallele bzw. antiparallele Dimere charakterisiert werden (Mao et al., 2005). Bei der parallelen Form weisen die SH2-Domänen der beiden Monomere in die gleiche Richtung. Hier wird die Verbindung der Monomere durch reziproke Bindung des phosphorylierten Tyrosin-701 eines Monomers in einer Mulde in der SH2-Domäne des zweiten Monomers hergestellt. Die antiparallele Form, bei der die SH2-Domänen in entgegengesetzte Richtungen des Dimers zeigen, wird dagegen durch Wechselwirkungen der Coiled-coil-Domäne des einen Monomers mit der DNA-Bindedomäne des korrespondierenden Monomers und umgekehrt stabilisiert. Zusätzlich werden antiparallele Dimere durch Interaktion der jeweiligen aminoterminalen Domänen unterstützt. Die Umlagerung des Dimers wird insbesondere möglich durch die flexible Verbindung der aminoterminalen Domäne mit dem Kernfragment von STAT1 (Mertens et al., 2006). Darüber hinaus besteht die Möglichkeit gegenseitiger Bindung zweier paralleler Dimere. Diese Tetramerisation wird durch Interaktion der aminoterminalen Domänen möglich und erlaubt die kooperative DNA-Bindung an benachbarten GAS-Bindestellen (Wenta et al., 2008).

2.3 Zielsetzung dieser Arbeit

Dysfunktionen von STAT-Proteinen können ein breites Spektrum an Infektionskrankheiten begünstigen und darüber hinaus sowohl zur Onkogenese (Bowman et al., 2000; Lee et al., 2000; Yu et al., 2009) als auch zur Beeinflussung von kardialen Erkrankungen (Kunisada et al., 2000) beitragen. Ihre genauere Untersuchung ist daher für die Medizin von besonderem Interesse und könnte weitere Erkenntnisse im Verständnis immunologischer Vorgänge sowie in der Pathogenese verschiedener Krankheiten erbringen.

Wie beschrieben scheint das flexible Element, das die aminoterminal Domäne von STAT1 mit der Coiled-coil-Domäne und damit mit dem Kern-

fragment verbindet, von großer Wichtigkeit für die Umlagerung der STAT1-Dimere in ihre unterschiedlichen Formen zu sein (Mertens et al., 2006). Da diese Umlagerung notwendig für die korrekte Funktion des Proteins und seines Signalweges ist, handelt es sich bei dieser flexiblen Verbindung um einen der kritischen Teile von STAT1. Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, die Funktion des Übergangsfragmentes in der aminoterminalen Coiled-coil-Domäne genauer zu untersuchen, um festzustellen, ob einzelne Aminosäuren dieser kurzen Sequenz für die Weiterleitung von Signalen aus Zytokinwegen notwendig sind. Dazu wurden mittels Punktmutation in diesem Bereich einzelne Aminosäuren ausgetauscht und die mutierten STAT1-Proteine auf mögliche Auswirkungen dieses Austausches nach Transfektion der entsprechenden Plasmid-DNA und Stimulation der Zellen mit Interferon getestet. Untersucht wurden dabei im Einzelnen die regelrechte Phosphorylierung der Proteine nach Zytokinstimulation, ihre Verteilung in Zytoplasma und Nukleus sowie die Befähigung zur DNA-Bindung und Transkriptionsaktivierung.

3 Material

3.1 Chemikalien

Die verwendeten Laborchemikalien stammen, sofern nicht näher bezeichnet, von den Firmen Carl Roth GmbH (Karlsruhe), Merck KGaA (Darmstadt), Sigma-Aldrich (Taufkirchen) und Thermo Fisher Scientific GmbH (Dreieich).

3.2 Radiochemikalien

Die Radiochemikalien α -[^{32}P]-dATP (3000 Ci/mmol), α -[^{32}P]-dCTP (3000 Ci/mmol), α -[^{32}P]-dGTP (3000 Ci/mmol) und α -[^{32}P]-dTTP (3000 Ci/mmol) wurden von PerkinElmer (Rodgau) bezogen.

3.3 Verbrauchsmaterialien

Alle benutzten Verbrauchsmaterialien wurden von den Firmen Bio-Rad Laboratories GmbH (München), Biometra GmbH (Göttingen), Carl Roth GmbH (Karlsruhe), Eppendorf AG (Hamburg), Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen), Nunc A/S (Roskilde, Dänemark), PEQLAB Biotechnologie GmbH (Erlangen), Sarstedt AG & Co. (Nürmbrecht), Schleicher & Schuell BioScience GmbH (Dassel), Thermo Fisher Scientific GmbH (Dreieich) und VWR International GmbH (Darmstadt) geliefert.

3.4 Antikörper

Antikörper	Hersteller
polyklonaler STAT1 α p91-Antikörper (C-24)	Santa Cruz Biotechnology Inc. (Santa Cruz, USA)
Phospho-STAT1-(Tyr701)-Antikörper	Cell Signaling Inc. (Danvers, USA)
polyklonaler Meerrettich-Peroxidase-konjugierter Anti-Kaninchen-Antikörper aus Ziege	Dako Denmark A/S (Glostrup, Dänemark)
Cy3-gekoppelter Anti-Kaninchen-Antikörper aus Ziege	Jackson ImmunoResearch Europe Ltd. (Suffolk, UK)

Tab. 2: Verwendete Antikörper

3.5 Enzyme und Inhibitoren

Enzym	Hersteller
Dpn I Endonuklease	Stratagene Inc. (La Jolla, USA)
PfuUltra-HF DNA-Polymerase	Stratagene Inc. (La Jolla, USA)
Complete-Mini Protease Inhibitoren	Roche Applied Science (Mannheim)
Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I	New England Biolabs GmbH (Schwalbach)

Tab. 3: Verwendete Enzyme und Inhibitoren

3.6 Reaktionskits

Kit	Hersteller
Absolute™-Blue-QPCR-SYBR®-Green- Mix	Thermo Fisher Scientific GmbH (Dreieich)
QuickChange II Site-Directed Mutagenesis Kit	Stratagene Inc. (La Jolla, USA)
PeqGold Plasmid-Mini-Prep-Kit	PEQLAB GmbH (Erlangen)
PeqGold-Total-RNA-Kit	PEQLAB GmbH (Erlangen)
QIAGEN Plasmid-Maxi-Kit	Qiagen GmbH (Hilden)
QIAGEN Plasmid-Plus-Maxi-Kit	Qiagen GmbH (Hilden)
Luciferase-Assay-System	Promega GmbH (Mannheim)
Verso™-cDNA-Kit	Thermo Fisher Scientific GmbH (Dreieich)
Western-Lightning® Plus ECL	PerkinElmer (Rodgau)

Tab. 4: Verwendete Reaktionskits

3.7 Bakterien und Medien

E.coli DH5α Stratagene Inc. (La Jolla, USA)

Genotyp: *F-φ80dlacZDM15 D(lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17(rk-mk+) phoA supE44 λthi-1 gyrA96 relA1*

E.coli XL1-Blue Stratagene Inc. (La Jolla, USA)

Genotyp: *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F'proAB lac^qZDM15 Tn10 (Tet^r)]*

Zur Bakterienkultur wurde LB-Medium aus 1% Trypton, 0,5% Hefeextrakt und 1% NaCl hergestellt und der pH-Wert auf 7,0 eingestellt. Vor Verwendung wurde das Medium für 20 min bei 121°C und 1,5 bar autoklaviert und je nach vorliegendem Resistenzgen 100 µg/mL Ampicillin oder 50 µg/mL Kanamycin als Selektionsmarker zugegeben. Zur Bakterienkultur auf LB-Agar wurde dem LB-Medium 1,5% Agar zugegeben.

Des Weiteren wurde SOC-Medium von Bioline GmbH (Luckenwalde) zur Kultur genutzt.

3.8 Zelllinien und Medien

Zelllinie	Beschreibung	Bezugsquelle
HeLa-S3	Humane Epithelzelllinie eines Zervixkarzinom	Zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. U. Vinke-meier
U3A	STAT1-defiziente Zelllinie entstanden aus 2fTGH mit rekombinantem IFN γ -Rezeptor	Zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. U. Vinke-meier

Tab. 5: Verwendete Zelllinien

Die Kultivierung und Passagierung der Zelllinien erfolgte nach Standardverfahren. Die folgenden supplementierten Medien wurden benutzt:

HeLa-S3-Vollmedium

Für das HeLa-S3-Vollmedium wurde Quantum 101 HeLa-Medium (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich) mit 1% Penicillin/Streptomycin (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich) versetzt.

U3A-Vollmedium

Das Vollmedium für U3A-Zellen bestand aus Dulbeccos modifiziertes Eagle-Medium (DMEM) (Biochrom AG, Berlin) versetzt mit 10% fötalem Kälberserum (FBS) (Biochrom AG, Berlin), 1% Penicillin/Streptomycin (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich) und 0,04 $\mu\text{g/mL}$ Puromycin (Sigma-Aldrich, Taufkirchen).

Oligonukleotide

Die unten aufgeführten Oligonukleotide für Mutagenese, Sequenzierung und Gelshift-Analysen wurden von Invitrogen AG (Carlsbad, USA) geliefert, die Oligonukleotide für Real-time-PCR wurden von TibMolBiol (Berlin) bezogen.

Name	Sequenz
L136A F	5'-GAATATTCAGAGCACAGTGATGGCAGACAAACAGA AAGAGCTTGAC-3'
L136A R	5'-GTCAAGCTCTTTCTGTTTGTCTGCCATCACTGTGCT CTGAATATTC-3'
D137A F	5'-GAATATTCAGAGCACAGTGATGTTAGCCAAACAGAA AGAGCTTGACAG-3'
D137A R	5'-CTGTCAAGCTCTTTCTGTTTGGCTAACATCACTGTG CTCTGAATATTC-3'
K138A F	5'-CAGAGCACAGTGATGTTAGACGCACAGAAAGAGCT TGACAGTAAAG-3'
K138A R	5'-CTTTACTGTCAAGCTCTTTCTGTGCGTCTAACATCAC TGTGCTCTG-3'
Q139A F	5'-GCACAGTGATGTTAGACAAAGCGAAAGAGCTTGAC AGTAAAGTC-3'
Q139A R	5'-GACTTTACTGTCAAGCTCTTTCGCTTTGTCTAACATC ACTGTGC-3'
D143A F	5'-GTTAGACAAACAGAAAGAGCTTGCAAGTAAAGTCAG AAATGTGAAG-3'
D143A R	5'-CTTCACATTTCTGACTTTACTTGCAAGCTCTTTCTGT TTGTCTAAC-3'
L136A/D137A F	5'-GAATATTCAGAGCACAGTGATGGCAGCCAAACAGAA AGAGCTTGACAG-3'
L136A/D137A R	5'-CTGTCAAGCTCTTTCTGTTTGGCTGCCATCACTGTG CTCTGAATATTC-3'

Tab. 6: Primer für Sequenz-spezifische Mutagenese

Name	Sequenz
171r	3'-TCTGCAAGGTTTTGCATTG-5'

Tab. 7: Primer zur Sequenzierung

Name	Sequenz
M67 F	5'-ACGTCGACATTTCCCGTAAATCTG-3'
M67 R	5'-CAGTCAGATTACGGGAAATGTCG-3'
2xGAS F	5'-AAGTCGTTTCCCCGAAATTGACGGATTTCCTCCG AAAC-3'
2xGAS R	5'-AAGTCGTTTCGGGGAAATCCGTCAATTCGGGGGA AAC-3'
GAS-nonGAS F	5'-ACGGCGTTTCCCCGAAATTGACGGATTACCCCA AC-3'
GAS-nonGAS R	5'-CAGGGTTGGGGTAAATCCGTCAATTCGGGGAA ACG-3'
2xnonGAS F	5'-ACGGCGTTTACCCCAAATTGACGGATTACCCCA AC-3'
2xnonGAS R	5'-CAGGGTTGGGGTAAATCCGTCAATTCGGGGTAAA CG-3'

Tab. 8: Oligonukleotide für Gelshift-Analysen

Name	Sequenz
STAT1 F	5'-CCGTTTTTCATGACCTCCTGT-3'
STAT1 R	5'-TGAATATTCCCCGACTGAGC-3'
GBP1 F	5'-GGTCCAGTTGCTGAAAGAGC-3'
GBP1 R	5'-TGACAGGAAGGCTCTGGTCT-3'
IRF1 F	5'-AGCTCAGCTGTGCGAGTGTA-3'
IRF1 R	5'-TAGCTGCTGTGGTCATCAGG-3'
MIG1 F	5'-CCACCGAGATCCTTATCGAA-3'
MIG1 R	5'-CTAACCGACTTGGCTGCTTC-3'
GAPDH F	5'-GAAGGTGAAGGTCGGAGTC-3'
GAPDH R	5'-GAAGATGGTGATGGGATTTC-3'

Tab. 9: Primer für Real-time-PCR

3.9 Plasmide

Name	Beschreibung	Quelle / Referenz
pEGFP-N1	Vektor zur Expression N-terminaler GFP-Fusionsplasmide in Säugerzellen	Clontech Laboratories Inc. (Mountain View, USA)
pSTAT1 α -GFP	Humane STAT1 α -cDNA (AS 1-747) kloniert in pEGFP-N1	Begitt et al., 2000
pSTAT1 α (L136A)-GFP	pSTAT1 α -GFP mit eingeführter Punktmutation nach Alanin an Position 136	selbst hergestellt
pSTAT1 α (D137A)-GFP	pSTAT1 α -GFP mit eingeführter Punktmutation nach Alanin an Position 137	selbst hergestellt
pSTAT1 α (K138A)-GFP	pSTAT1 α -GFP mit eingeführter Punktmutation nach Alanin an Position 138	selbst hergestellt
pSTAT1 α (Q139A)-GFP	pSTAT1 α -GFP mit eingeführter Punktmutation nach Alanin an Position 139	selbst hergestellt
pSTAT1 α (D143A)-GFP	pSTAT1 α -GFP mit eingeführter Punktmutation nach Alanin an Position 143	selbst hergestellt
pSTAT1 α (L136A/D137A)-GFP	pSTAT1 α -GFP mit eingeführter Punktmutation nach Alanin an Position 136 und 137	selbst hergestellt
pcDNA3.1	Säugetierzell-Expressionsplasmid	Invitrogen AG (Carlsbad, USA)
pcDNA3.1-STAT1 α	Humane STAT1 α -cDNA kloniert in pcDNA3.1	Dr. James E. Darnell, New York, USA
pcDNA3.1-STAT1 α (L136A)	pcDNA3.1-STAT1 α mit eingeführter Punktmutation nach Alanin an Position 136	selbst hergestellt

pcDNA3.1-STAT1α (D137A)	pcDNA3.1-STAT1α mit eingeführter Punktmutation nach Alanin an Position 137	selbst hergestellt
pcDNA3.1-STAT1α (K138A)	pcDNA3.1-STAT1α mit eingeführter Punktmutation nach Alanin an Position 138	selbst hergestellt
pcDNA3.1-STAT1α (Q139A)	pcDNA3.1-STAT1α mit eingeführter Punktmutation nach Alanin an Position 139	selbst hergestellt
pcDNA3.1-STAT1α (D143A)	pcDNA3.1-STAT1α mit eingeführter Punktmutation nach Alanin an Position 143	selbst hergestellt
pcDNA3.1-STAT1α (L136A/D137A)	pcDNA3.1-STAT1α mit eingeführter Punktmutation nach Alanin an Position 136 und 137	selbst hergestellt
pβGal	β-Galaktosidase-Expressionsplasmid	Stratagene Inc. (La Jolla, USA)
p3xLy6E	IFNγ-abhängiger Reporter-genvektor	Wen et al., 1995
pIC-339	Plasmid mit dem trunkierten Promoter des humanen ICAM-1-Gens	Prof. Dr. P.T van der Saag, Utrecht, Niederlande
pIC-1352	Plasmid mit dem Promoter des humanen ICAM-1-Gens	Prof. Dr. P.T van der Saag, Utrecht, Niederlande

Tab. 10: Verwendete Plasmide

4 Methoden

4.1 Einführung von Punktmutationen in Plasmide

Zur Gewinnung von Plasmiden, die für mutierte STAT1-Proteine kodieren, wurde das „QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kit“ verwendet. Mit Hilfe dieses Kits lassen sich Punktmutationen sowie kleine Insertionen und Deletionen in vorhandene Plasmide einführen. Dazu werden neben einer methylierten DNA-Vorlage, die für den Wildtyp des zu mutierenden Proteins kodiert, Primer benötigt, welche die einzuführende Mutation enthalten. Durch eine Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) werden nun neue, die Mutation tragende linearisierte DNA-Amplifikate synthetisiert. Während die verwendete DNA-Matrize aus methylierter DNA bestehen muss, ist die neu in der Reaktion entstandene DNA nicht methyliert. Auf diese Weise lässt sich im Anschluss an die PCR die nun unerwünschte Vorlage durch eine Endonuklease, die selektiv methylierte DNA verdaut, entfernen.

Das Kit wurde laut Protokoll des Herstellers verwendet. Der 50 µl-Reaktionsansatz bestand aus 25 ng methylierter Matrizen-DNA (STAT1-Wildtyp-kodierende Plasmide), jeweils 125 ng der komplementären, die gewünschte Mutation tragenden Primer, 1 µl eines Desoxynukleotidmixes (dNTP) und 5 µl 10x Puffer. Abschließend wurden 2,5 Einheiten PfuUltra HF DNA Polymerase zugegeben. Die Mutagenese wurde im Thermo-Cycler mit folgendem Programm durchgeführt:

Zyklen	Temperatur	Zeit
1	95° C	30 Sek.
16	95° C	30 Sek.
	55° C	60 Sek.
	68° C	14 Min.

Tab. 11: Cycler-Programm für Mutagenese

Dieses Programm umfasst zunächst einen vorgeschalteten Schritt zur Denaturierung der doppelsträngigen DNA-Vorlage, gefolgt von 16 Zyklen bestehend aus Schritten zur Denaturierung, Hybridisierung und Elongation der DNA. Zum Verdau der noch unverändert vorliegenden DNA-Matrize wurden nun 10 Einheiten Dpn I Restriktionsenzym zugegeben und eine Stunde bei 37° C inkubiert. Die so gereinigte, neue DNA wurde anschließend in XL1-Blue superkompetente Bakterien transformiert.

4.2 Transformation von Plasmid-DNA in kompetente Bakterien

Zur Transformation wurden entweder *E.coli* XL1-Blue superkompetente Bakterien oder *E.coli* DH5α chemisch kompetente Bakterien verwendet. Dabei wurden zunächst je Ansatz 50 µl (XL1-Blue) bzw. 100 µl (DH5α) der Bakterien vorsichtig auf Eis aufgetaut und anschließend unter Zusatz von 1 µl Mutageneseprodukt bzw. 10 ng Plasmid-DNA für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Es folgte ein Hitzeimpuls für 45 Sekunden (XL1-Blue) bzw. 30 Sekunden (DH5α) bei 42° C im Wasserbad sowie eine weitere zweiminütige Inkubation auf Eis. Nach Zugabe von 0,5 ml (XL1-Blue) bzw. 1 ml (DH5α) SOC-Medium wurden die Bakterien für eine Stunde bei 37° C und 225 rpm inkubiert und anschließend 250 µl der Kultur auf Platten mit LB-Agar, versetzt mit einem dem Resistenzgen der Plasmide entsprechenden Antibiotikum, ausplattiert. Die Platten wurden nun über Nacht im Brutschrank bei 37° C inkubiert.

4.3 Gewinnung von Plasmid-DNA aus Bakterien

Die Isolation von Plasmid-DNA im analytischen Maßstab aus Bakterienkulturen erfolgte mit Hilfe des peqGold Plasmid Miniprep I - Kits. Für präparative Zwecke wurde das Qiagen Plasmid Maxi-Kit verwandt.

Für die analytische Präparation wurde zunächst 5 ml LB-Medium mit entsprechendem Selektionsantibiotikum mit einer einzelnen Bakterienkolonie angeimpft und über Nacht bei 37° C und 225 rpm auf dem Schüttler inkubiert. Anschließend wurde die Kultur durch einminütige Zentrifugation bei 10.000 g pelletiert. Im Folgenden wurde entsprechend des Herstellerprotokolls des Kits das Pellet lysiert, die Plasmid-DNA extrahiert und schließlich zur Sequenzierung vorbereitet.

Für präparative Zwecke wurde 2 ml LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum mit einer Bakterienkolonie angeimpft und für 8 Stunden bei 37° C und 225 rpm inkubiert. Anschließend wurden jeweils 1 ml der Kultur in 150 ml LB-Medium mit Antibiotikum überführt und über Nacht erneut bei 37° C und 225 rpm inkubiert. Die Bakterien dieser Übernachtskultur wurden dann durch Zentrifugation bei 6.000 g für 15 Minuten pelletiert und die DNA mit Hilfe des Plasmid Maxi-Kits isoliert. Die Konzentration der gewonnenen DNA wurde photometrisch bestimmt, die DNA aliquotiert und bei -20° C eingefroren.

4.4 Sequenzierung von DNA

Zur Überprüfung der eingeführten Mutationen wurden die isolierten Plasmide sequenziert. Dazu wurden 7 µL Ansätze mit 700 ng Plasmid-DNA und 20 pmol Sequenzierprimer angefertigt. Die Sequenzierung selbst wurde von den Seqlab-Sequence-Laboratories (Göttingen) durchgeführt.

4.5 Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Konzentration isolierter Plasmide wurde photometrisch mit Hilfe des GeneQuant II (Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden) Photometers bestimmt. Dazu wurden Proben der zu analysierenden DNA-Lösungen im Verhältnis 1:50 mit Wasser verdünnt, um anschließend in einer Quarzküvette bei 260 nm die Absorption zu messen. Die Konzentration der DNA-Lösungen

ließ sich dann gemäß der Formel $c(\text{DNA}) = A_{260} \times 50 \times \text{Verdünnungsfaktor}$ berechnen. Um Verunreinigungen der DNA-Lösungen auszuschließen, wurde der Quotient von Absorptionsmessungen bei 260 nm und 280 nm gebildet. Bei nicht verunreinigten DNA-Proben beträgt der Quotient 1,8.

4.6 Transfektion von Säugerzellen

Die Transfektion von STAT1-kodierender Plasmid-DNA in humane Zelllinien wie HeLa-S3 und U3A erfolgte mit Hilfe des Transfektionsreagenz MegaTran 1.0 (Origene, Rockville, USA). Vor Beginn der Transfektion wurde lichtmikroskopisch die Zelldichte der Kulturen überprüft. Diese sollte für eine optimale Transfektion bei etwa 50-70% liegen. Für die Transfektionsansätze wurde Plasmid-DNA vorsichtig mit 150 mM steril filtrierter NaCl-Lösung gemischt, MegaTran 1.0 zugegeben und der Ansatz für 10 Sek. gevortext. Nach 10-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde der Transfektionsansatz auf die Zellen gegeben. Die Menge an Reagenzien pro Loch bzw. Kammer einer entsprechenden Platte sind der folgenden Tabelle zu entnehmen.

Größe der Kultur	Plasmid-DNA	NaCl-Lösung	MegaTran 1.0
6-Loch-Platte	1,6 µg	160 µl	4,8 µl
48-Loch-Platte	0,25 µg	50 µl	1,5 µl
8-Kammer-Objektträger	0,2 µg	20 µl	0,6 µl

Tab. 12: Transfektionsreagenz für verschiedene Zellkulturplatten

4.7 Zellextraktion

Zur Herstellung von Zellextrakten für Western-Blot-Analysen und EMSA-Assays wurden die Zellen in 6-Loch-Platten nach der oben beschriebenen Methode transfiziert und für ~16h im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für 45 Min. mit 5 ng/mL IFN γ (in 1 mL HeLa-Vollmedium)

stimuliert und ggf. im Anschluss mit PBS gewaschen, bevor sie für 15, 30 oder 45 Min. mit 1 μ M Staurosporin behandelt wurden. Nach der Stimulation wurden die Zellen erneut mit PBS gewaschen. Die Zellyse erfolgte in 35 μ L zytosolischem Extraktionspuffer (10 mM KCl, pH 7,4, 1 mM EDTA, 10% (v/v) Glycerol, 20 mM Hepes, 1 mM Natrium-ortho-Vanadat) für 5 Min. auf Eis. Kurz vor Verwendung des Puffers wurden ihm noch 0,1% IGEPAL-CA-360, 3 mM DTT, Complete-Mini-Protease-Inhibitoren und 0,4 mM Pefabloc zugesetzt. Im Anschluss wurden die lysierten Zellen mit Hilfe eines Zellschabers von der Platte gelöst und, im Extraktionspuffer suspendiert, in 1,5 mL Reaktionsgefäße überführt. Diese wurden im Anschluss für 15 Sek. bei 13.000 rpm und 4° C zentrifugiert. Die Überstände wurden in neue Reaktionsgefäße überführt und erneut für 5 Min. bei 13.000 rpm und 4° C zentrifugiert, während der Niederschlag in 35 μ L nukleärem Extraktionspuffer (420 mM KCl, pH 7,4, 1 mM EDTA, 20% (v/v) Glycerol, 20 mM Hepes, 0,1 mM Natrium-ortho-Vanadat) resuspendiert wurde. Dem nukleären Extraktionspuffer wurden vor Verwendung 3 mM DTT, Complete-Mini-Protease-Inhibitoren und 0,4 mM Pefabloc zugesetzt. Nach 30-minütiger Inkubation auf Eis wurden die nukleären Zellextrakte für 15 Min. bei 13.000 rpm und 4° C zentrifugiert und im Anschluss zytosolische und nukleäre Zellextrakte zu gleichen Teilen gemischt. Für Western-Blot-Assays wurde den Zellextrakten noch 6-fach SDS-Probenpuffer, bestehend aus 8% Natriumlaurylsulfat, 350 mM Tris-HCl, pH 6,8, 30% (v/v) Glycerol, 10% β -Mercaptoethanol und 0,04% Bromphenolblau zugesetzt, die Proben für 3 Min. bei 95°C im Heizblock denaturiert und anschließend bis zur weiteren Verwendung bei -20°C im Gefrierschrank gelagert. Für EMSA-Experimente wurden die Proben nicht denaturiert und bei -80°C aufbewahrt.

4.8 SDS-Gelelektrophorese

Mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (modifiziert nach Laemmli, 1970) wurden die Proteine der wie oben beschrieben hergestellten Zellextrakte aufgetrennt. Dazu wurden 10%-ige Gele auf der Basis von Rotipho-

rese Gel 30 (Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1)-Lösung) mit 4x Trenngelpuffer (1,5 M Tris-HCl, 0,4% SDS, pH 8,8), 0,03% APS und 0,16% TEMED gegossen. Nach dem Einfüllen in Platten der Größe 80 x 80 mm (Abstand 1 mm) wurde das Trenngel mit Isopropanol überschichtet. Nach vollständiger Polymerisation des Trenngels und Entfernen des Isopropanols wurde das Gel durch eine Schicht aus 5%-igem Sammelgel bestehend aus Rotiphorese Gel 30, 4x Sammelgelpuffer (0,5 M Tris-HCl, 0,4% SDS, pH 6,8), 0,06% APS und 0,2% TEMED aufgefüllt, mit einem Probenauftragskamm versehen und erneut eine vollständige Polymerisation des Gels abgewartet. Die Gele wurden anschließend in dem vertikalen Gelelektrophoresesystem Mini-Twin (Bio-metra) befestigt, die eingefrorenen Zellextrakte erneut für 3 Min. bei 95° C aufgeköcht und je Geltasche 18 µL Probe aufgetragen. Die Elektrophorese wurde bei 11 mA pro Gel in SDS-Laufpuffer (25 mM Tris-Base, 192 mM Glycin, 0,1% SDS, pH 8,6) durchgeführt.

4.9 Western-Blotting

Die während der Gelelektrophorese aufgetrennten Proteine wurden im Anschluss im Semi-dry-Blot-Verfahren nach Eckerskorn et al. (1988) auf eine PVDF-Membran (Millipore) übertragen. Für dieses Verfahren wurde Methanol auf die PVDF-Membran gegeben und diese für 5 Min. inkubiert. Die dadurch hydrophilisierte Membran wurde dreifach für jeweils 5 Min. mit Transferpuffer (25 mM Tris-Base, 150 mM Glycin, 10% Methanol, pH 8,0) gewaschen. Das Gel wurde anschließend aus der Elektrophorese-Apparatur genommen und Pufferreste mit Wasser entfernt. Auf die Anodenplatte einer PerfectBlue-Semi-Dry-SEDEC-M-Blotapparatur (Peglab) wurden nun zwei mit Transferpuffer befeuchtete Filterpapiere, die vorbereitete PVDF-Membran, das Gel sowie zwei weitere feuchte Filterpapiere übereinander gestapelt und durch Abrollen mit einer Walze verbliebene Luftblasen entfernt. Im Anschluss konnte die Kathodenplatte aufgesetzt und die Blotkammer fest verschraubt werden. Der Elektrotransfer erfolgte für 1½ h bei 80 mA pro Gel. Nach Abschluss des Transfers wurde die Membran aus der Apparatur entfernt und

für 1 h mit Roti-Block inkubiert. Durch diesen Schritt wurden verbliebene, freie Bindungsstellen auf der Membran blockiert. Anschließend wurde der primäre Anti-Phospho-STAT1-Antikörper 1:1000 in Roti-Block verdünnt, auf die Membran gegeben und bei 4° C über Nacht unter Schütteln inkubiert. Am Folgetag wurde die Membran fünfmal für jeweils 5 Min. mit PBS-T (1,5 M NaCl, 100 mM Na₂HPO₄, 15 mM K₂HPO₄, 30 mM KCl, pH 7,4 mit 0,1% Tween20) gewaschen und anschließend der sekundäre polyklonale Meerrettich-Peroxidase-konjugierte Anti-Kaninchen-IgG-Antikörper aus Ziege, 1:1000 in Roti-Block verdünnt, auf die Membran gegeben und für 1 h bei RT unter Schütteln inkubiert. Nach erneutem fünffachen Waschen für je 5 Min. in PBS-T und in Wasser wurde der Blot mit dem Western-Lightning-Chemiluminescence-Reagent-Plus-Kit (Perkin Elmer) gemäß Herstellerangaben entwickelt und anschließend Autoradiographiefilme (GE Healthcare, Uppsala, Schweden) mit Hilfe der Membranen belichtet. Die belichteten Filme wurden in einem Optimax Typ TR Entwickler (MS Laborgeräte, Heidelberg) entwickelt.

Zur Überprüfung der aufgetragenen STAT1-Menge wurde zunächst der Anti-Phospho-STAT1-Antikörper durch stringentes Waschen mit Ablösepuffer (2% SDS, 0,7% β-Mercaptoethanol, 62,5 mM Tris-HCl, pH 6,8) für 60° C im Schüttelbad entfernt. Anschließend wurde die Membran vierfach für jeweils 15 Min. bei Raumtemperatur mit PBS-T unter Schütteln gewaschen und erneut für 1 h in Roti-Block blockiert. Danach wurde die Membran für 1 h unter Schütteln mit polyklonalem Anti-STAT1-Antikörper C-24 (1:2000 in Roti-Block) inkubiert, nochmals fünfmalig für 5 Min. mit PBS-T unter Schütteln gewaschen und mit dem sekundären Antikörper für 1 h inkubiert. Nach weiterem fünfmaligen Waschen mit PBS-T wurde der Blot wie bereits zuvor entwickelt.

4.10 EMSA

Um die Kompetenz zur DNA-Bindung von STAT1-WT und den STAT1-Mutanten vergleichend zu analysieren, wurden elektrophoretische Mobilitätsshiftassays (EMSA) durchgeführt (Begitt et al., 2000). Für diese Analysen wurden radioaktiv markierte doppelsträngige Oligonukleotide mit einer einzelnen STAT1-Bindestelle (M67), mit einer doppelten Bindestelle (2xGAS), einer intakten sowie einer degenerierten Bindestelle (GAS-nonGAS) und mit zwei degenerierten Bindestellen (2xnonGAS) verwendet. Um diese herzustellen wurden zunächst jeweils 50 pmol/mL der komplementären einzelsträngigen Oligonukleotide in einem Oligo-Puffer (10 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 20 mM Tris-HCl, pH 7,5) aufgenommen und zur Hybridisierung zuerst für 5 Min. auf 95° C erhitzt und anschließend langsam auf Raumtemperatur abkühlen gelassen. Die hybridisierten Oligonukleotide wurden bei -20° C gelagert. Zur radioaktiven Markierung der Oligonukleotide wurden die überhängenden Enden mit Hilfe von Klenow-Polymerase von *E.coli* (New England Biolabs) mit radioaktiv-gelabelten Desoxynukleotiden durch 25-minütige Inkubation bei Raumtemperatur ergänzt. Der Reaktionsansatz enthielt hierbei 0,1 ng doppelsträngige Oligonukleotide, jeweils 8 µL der vier [³²P]-markierten Nukleotide (3 mM), 5 µL 10x Eco-Pol-Puffer (New England Biolabs) sowie 5 U Klenow-Enzym. Im Anschluss wurden 1 µL unmarkierte Desoxynukleotide (6,5 mM je Nukleotid) zugegeben, weitere 5 Min. bei RT inkubiert und schließlich die Reaktion durch Zugabe von 1 µL 0,5 M EDTA-Lösung beendet. Um überschüssige Nukleotide aus dem Ansatz zu entfernen, wurde dieser auf Illustra-MicroSpin-G-25-Säulen (GE Healthcare) gegeben und bei RT für 3 Min. bei 700 g zentrifugiert.

Für den eigentlichen Gelshift wurden die Proben wie folgt vorbereitet: Pro Probe wurde 4,5 µL Zellextrakt aus entweder mit 5 ng/µl IFN γ stimulierten oder unstimulierten U3A-Zellen, 0,2 µL der markierten Oligonukleotide, 1 µL einer Polydesoxyinosidphosphat-Desoxycytidinphosphat-Lösung (mittlere Länge ca. 800 Bp, 2 mg/mL), 1,3 µL DTT (110 mM), 3,5 µL Wasser und 2,5 µL 5x Gelshift-Puffer (100 mM HEPES, pH 7,9, 20% Ficoll, 5 mM MgCl₂,

200 mM KCl, 0,5 mM EGTA, 2,5 mM EDTA) gemischt und für 15 Min. bei RT inkubiert. Für Supershift-Reaktionen zur Identifizierung der gebildeten STAT1-DNA-Komplexe wurde den Ansätzen zusätzlich 1,3 µL polyklonaler STAT1-Antikörper C-24, verdünnt in PBS im Verhältnis 1:10, zugegeben. Für die Elektrophorese wurden 4,8%-ige TBE-Polyacrylamid-Gele aus Rotiphorese Gel 40 (Acrylamid/Bisacrylamid im Verhältnis 29:1) unter Verwendung von TEMED und APS vorbereitet und äquilibriert. Nach Beladen der Gele mit den präparierten DNA-Protein-Komplexen wurden diese für 2,5 h bei 4° C und 300 V in 0,25x TBE-Puffer (2,3 mM Tris-Base, 2,3 mM Borsäure, 0,05 mM EDTA) aufgetrennt. Die Gele wurden anschließend auf Whatman-Papier in einer Vakuumkammer getrocknet, eine Imaging-Platte über Nacht mit dem Gel exponiert und schließlich mit einem Fujifilm BAS-1000 Phosphor-Imager (Fuji, Düsseldorf) ausgelesen.

4.11 Fluoreszenzmikroskopische Präparate

Für die Herstellung fluoreszenzmikroskopischer Präparate wurden HeLa-S3-Zellen auf LabTek-Chamber-Slides mit 8 Kammern, wie unter „Transfektion von Säuger-Zellen“ beschrieben, transfiziert und am folgenden Tag stimuliert. Dazu wurden die Zellen entweder für 1 h mit 5 ng/mL IFN γ (in 1 mL HeLa-Vollmedium) stimuliert oder zusätzlich im Anschluss für 1, 2 oder 3 h mit 1 µM Staurosporin (in Vollmedium) inkubiert. Nach der Stimulation wurden die Zellen für 15 Min. mit 4% Roti-Histofix bei RT fixiert, dreimalig mit PBS gewaschen und die Kerne anschließend für 10 Min. bei RT mit Hoechst 33258 (5 µg/mL in PBS) unter Schütteln gefärbt. Anschließend wurde erneut mit PBS und Wasser gewaschen, die Zellkammern vom Objektträger getrennt und der Träger mit Deckgläsern und Fluoromount-G-Eindeckmedium (Southern Biotech, Birmingham, USA) eingedeckt. Die Präparate konnten danach mit einem Mikroskop DM5000B (Leica, Wetzlar) beurteilt werden. Dazu wurden die GFP-gekoppelten STAT1-Proteine durch Licht mit einer Wellenlänge von 480 nm, die mit Hoechstfarbstoff angefärbten Zellkerne bei einer Wellenlänge von 280 nm zur Fluoreszenz angeregt. Mit

Hilfe einer CCD-Kamera und des Computerprogrammes QWin (Leica) wurden digitale Aufnahmen angefertigt.

4.12 Immunzytochemische Präparate

Zur immunzytochemischen Darstellung von nicht GFP-markiertem STAT1 in U3A-Zellen wurden diese ebenfalls in Chamber-Slides transfiziert und analog zu den HeLa-S3-Zellen stimuliert. Nach der Stimulation wurden die Zellen bei -20° C mit vorgekühltem Methanol für 10 Min. fixiert, anschließend mit PBS gewaschen und für 20 Min. mit 1% Triton-X-100 in PBS bei RT unter Schütteln permeabilisiert. Dann erfolgte eine 45 Min. Inkubation mit 25% FBS in PBS, um unspezifische Bindungsstellen zu besetzen, bevor die Zellen für 45 Min. bei RT unter Schütteln mit dem primären Anti-STAT1-Antikörper p91 (C-24) (1:1000 in 25% FBS in PBS) inkubiert wurden. Anschließend wurde dreimalig mit PBS gewaschen und die Zellen mit sekundärem Cy3-gekoppeltem Anti-Kaninchen-IgG-Antikörper aus Ziege (1:500 in 25% FBS in PBS) erneut für 45 Min. unter Schütteln bei Raumtemperatur inkubiert. Überschüssiger Antikörper wurde nun durch dreimaliges Waschen mit PBS entfernt und die Zellkerne analog zur oben beschriebenen Methode mit Hoechst gefärbt und eingedeckt.

Die Detektion der Fluoreszenzverteilung erfolgte bei einer Wellenlänge von 550 nm zur Anregung der Cy3-gekoppelten Antikörper bzw. mit einer Wellenlänge von 280 nm zur Anregung der gefärbten Zellkerne.

4.13 Reporteragen-Assays

Luciferase-Reporteragen-Assays wurden eingesetzt, um die IFN γ -stimulierte Genexpression von STAT1-Mutanten im Vergleich mit STAT1-Wildtyp zu untersuchen. Hierzu wurde ein Reporteragenkonstrukt mit einem synthetischen Promotor aus drei GAS-Bindestellen des IFN γ -induzierbaren Ly6E-

Gens (Wen et al., 1995) bzw. einer der beiden Reporter-genkonstrukte pIC-339 und pIC-1352 mit Fragmenten des nativen ICAM-1 Promotors mit einer einzelnen kanonischen GAS-Bindestelle (Van de Stolpe et al., 1994) benutzt. Außerdem wurde ein IFN-unabhängiger β -Galactosidase-Reporter eingesetzt, um die Luciferase-Aktivität zu normieren und Fehler durch etwaige ungleiche Effektivität der Transfektion zu vermeiden.

Für die Durchführung der Experimente wurden U3A-Zellen, die in 48-Loch Platten ausgesäht wurden, mit den entsprechenden STAT1-Plasmiden transfiziert. Zusätzlich zu 0,25 μ g STAT1-Vektor (s. „Transfektion von Säuger-Zellen“) wurden pro Loch 70 ng 3xLy6E-Vektor bzw. pIC-339/pIC-1352 sowie 200 ng β -Galactosidase-Reporterplasmid in die Zellen eingebracht. Am Folgetag wurden die Zellen für 6 h mit 5 ng/mL IFN γ stimuliert oder unstimuliert belassen. Im Anschluss wurde das Medium entfernt und die Zellen für 15 Min. bei RT mit 100 μ L Triton-Glycyl-Glycin-Puffer (25 mM Glycylglycin, pH 7,8, 1% Triton-X-100, 15 mM MgSO $_4$, 4 mM EGTA) lysiert. Unmittelbar vor der Lyse wurden dem Puffer noch Complete-Mini-Protease-Inhibitoren, 3 mM DTT und 0,4 mM Pefabloc frisch zugesetzt. Das Zelllysate wurde in 1,5 mL Reaktionsgefäße überführt und für 15 Min bei 4° C und 13.000 rpm zentrifugiert. 20 μ L des Überstandes wurden in eine weiße 96-Loch Mikrotiterplatte gegeben und die Luciferase-Aktivität unter Zugabe von 50 μ L Luciferasesubstrat im Luminometer Centro-LB-960 (Berthold Technologies, Bad Wildbad) bestimmt. Im Anschluss wurden weitere 20 μ L des Lysats in Halbmikroküvetten überführt und die Farbreaktion durch Zugabe von 280 μ L einer Lösung bestehend aus 211 μ L Natriumphosphat-Puffer (10 mM, pH 7,2) versetzt mit 66 μ L o-Nitrophenyl- β -D-Galactopyranosid (ONPG, 4 mg/mL in 100 mM Natriumphosphat-Puffer) und 3 μ L 100x Magnesium-Lösung (100 mM MgCl $_2$, 4,5 mM β -Mercaptoethanol) gestartet. Nach 15 - 20 Min. Inkubation und Einsetzen einer deutlichen Gelbfärbung wurde die Reaktion durch die Zugabe von 500 μ L des Stop-Puffers (0,5 M Na $_2$ CO $_3$) beendet und bei 420 nm die Absorption mit einem Nicolet-Evolution-100-Photometer (Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich) gemessen. Mit Hilfe der Software Excel® (Microsoft Corporation, Redmond, USA) wurde der Quotient aus den

Messwerten der Luciferase-Aktivität und der Galactosidase-Reaktion berechnet und mit dem Programm SigmaPlot™ (Systat Software GmbH, Erkrath) Mittelwert und Standardabweichung der durchgeführten sechsfachen Bestimmung ermittelt und grafisch dargestellt.

4.14 RNA-Isolation

Zur Isolation von RNA wurden U3A-Zellen in 6-Loch-Platten kultiviert und mit entsprechenden STAT1-kodierenden pcDNA-Plasmiden transfiziert. 24 h nach erfolgter Transfektion wurde das Kulturmedium gegen U3A-Medium mit 1% FBS ausgetauscht und die Zellen über Nacht kultiviert. Am Folgetag wurden die Zellen entweder unbehandelt gelassen oder für 6 h mit 5 ng/mL IFN γ stimuliert. Nach Entfernen des Mediums wurde die RNA mit Hilfe des peqGold-Total-RNA-Kits gemäß der Herstellerangaben aus den Zellen extrahiert und in 50 μ L Wasser aufgenommen. Die erhaltene RNA-Lösung wurde zur Synthese von cDNA genutzt und überschüssige RNA-Lösung zur späteren Verwendung bei -80°C gelagert.

4.15 cDNA-Synthese

Zur Herstellung von cDNA mittels reverser Transkriptase wurde das Verso-cDNA-Kit (Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich) laut Informationen des Herstellers angewandt und die erhaltenen Proben bei -20°C bis zur weiteren Nutzung aufbewahrt.

4.16 Real-Time-PCR

Real-Time-PCR-Analysen wurden mit Hilfe des Absolute™-Blue-QPCR-SYBR®-Green-Mix-Kits laut Angaben des Herstellers nach folgendem Temperaturschema vorgenommen:

Zyklen	Vorgang	Temperatur	Zeit
1	Enzymaktivierung	95°C	15 Min.
50	Denaturierung	95°C	15 Sek.
	Hybridisierung	55°C	30 Sek.
	Elongation	72°C	30 Sek.
1	Schmelzkurve		

Tab. 13: Programm der Realtime-PCR

Je 25 µL Reaktionsansatz wurde 1 µL der zuvor synthetisierten cDNA eingesetzt. Jede Probe wurde dabei doppelt bestimmt. Zur Real-Time-Analyse wurden die Geräte iCycler-iQ5 (Bio-Rad) und Mastercycler-ep-realplex² (Eppendorf) mit jeweils zugehöriger Software genutzt. Zur Auswertung nach der $\Delta\Delta$ -Ct-Methode (Pfaffl, 2001) wurden die Computerprogramme Excel und SigmaPlot genutzt.

4.17 Darstellung der STAT1-Struktur

Die räumliche Darstellung des STAT1-Proteins wurde mit Hilfe des Computerprogrammes Cn3D 4.1 (National Center for Biotechnology Information (NCBI), Bethesda, USA) und der Software PyMOL (DeLano Scientific LLC, Portland, USA) vorgenommen. Die verwendeten Strukturdaten entstammen der Strukturdatenbank der NCBI.

5 Ergebnisse

5.1 Durch Mutagenese in das STAT1-Protein eingeführte Mutationen

Mit Hilfe der gerichteten Mutagenese wurden folgende Aminosäuren des STAT1-Proteins nach Alanin mutiert: L136A, D137A, K138A, Q139A und D143A sowie die Doppelmutation L136A/D137A. Die Mutationen wurden durch Sequenzierung bestätigt. Abbildung 2 zeigt die Position der aufgezählten Mutationen auf der Oberfläche eines STAT1-Dimers.

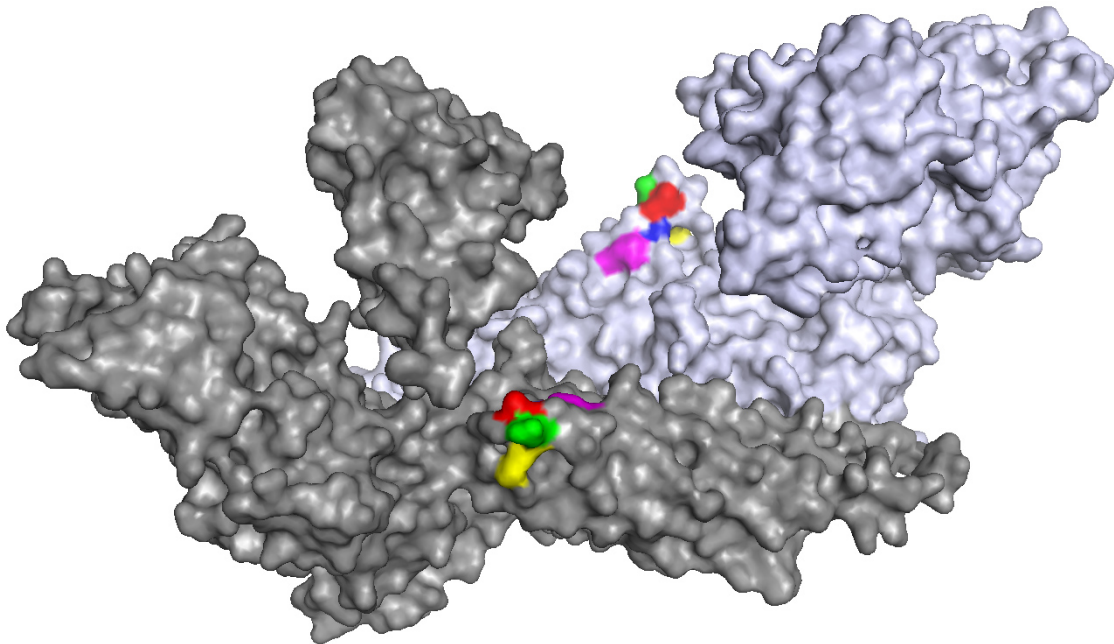


Abb. 2: Darstellung der eingeführten Mutationen anhand eines STAT1-Dimers

(dunkelgrau: Monomer 1; blaugrau: Monomer 2); farbig markiert sind die mutierten Aminosäuren (rot: L136, grün: D137, gelb: K138, blau: Q139, violett: D143).

Die Zuordnung der Aminotermini zum trunktierten STAT1-Molekül ist nicht durch die kristallographischen Strukturdaten abgedeckt und erfolgte hier willkürlich.

5.2 Intrazelluläre Verteilung von GFP-markiertem STAT1 in der Fluoreszenzmikroskopie

Die intrazelluläre Verteilung der mutierten STAT1-Proteine und der STAT1-Wildtyp-Moleküle wurde durch fluoreszenzmikroskopische Analysen bestimmt und miteinander verglichen.

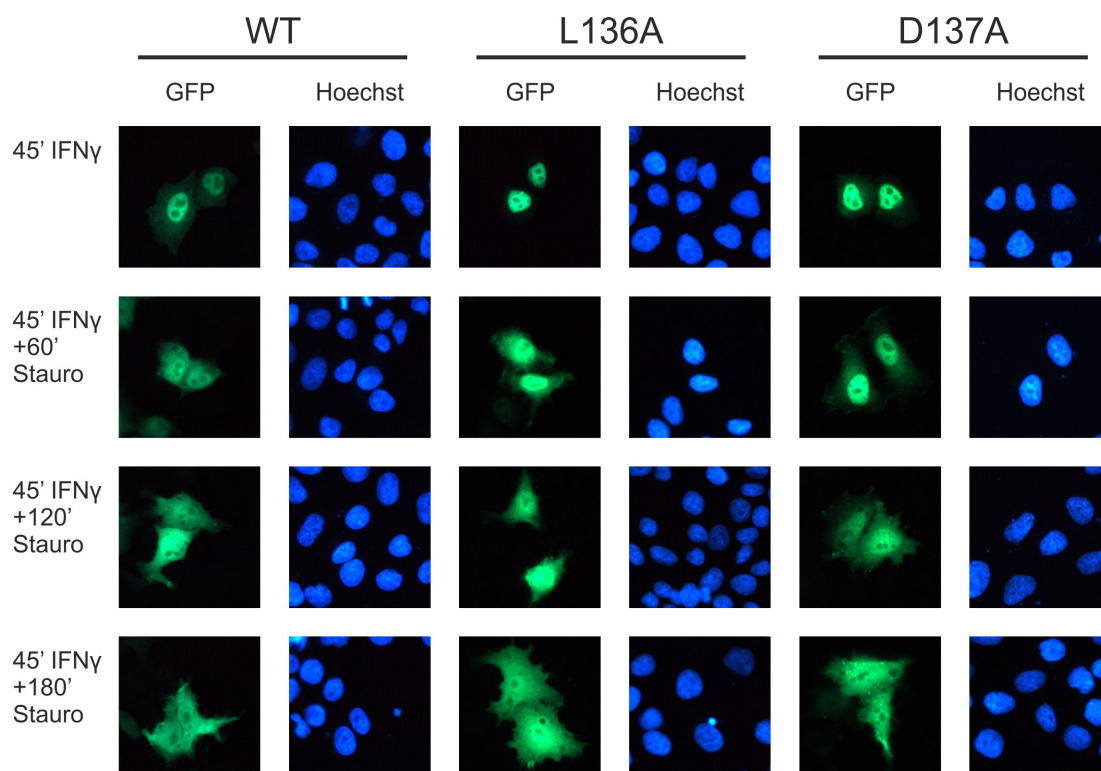


Abb. 3: Die STAT1-Mutanten L136A und D137A unterscheiden sich in ihrer Kernakkumulation nicht von dem Wildtyp.

Gezeigt sind fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von jeweils typischen Zellen, die GFP-markierte STAT1-Proteine exprimieren. Diese Ausschnitte sind jeweils bei einer Wellenlänge von 480 nm zur Anregung des grün-fluoreszierenden Proteins sowie bei einer Wellenlänge von 280 nm zur Detektion des zur Kernfärbung genutzten Hoechst-Farbstoffes aufgenommen. Nach 45-minütiger Interferon- γ -Stimulation gefolgt von 0-, 60-, 120- oder 180-minütiger Inkubation mit Staurosporin wurden die Präparate mit Roti-Histofix fixiert. Man erkennt sowohl bei dem Wildtyp als auch bei den beiden Mutanten eine deutliche Kernakkumulation nach IFN γ -Stimulation. Nach 60-minütiger Inkubation mit Staurosporin lässt die Kernakkumulation nach und kommt nach 120 Min. zum Zusammenbruch. Nach 180 Min. lässt sich keine Kernakkumulation mehr erkennen.

Dazu wurden in die humane HeLa-S3-Zelllinie Plasmide mit GFP-markierten STAT1-Proteinen eingebracht. Die Zellen wurden zunächst für 60 Min. mit Interferon- γ stimuliert und im Anschluss für 180 Minuten mit dem Kinaseinhibitor Staurosporin inkubiert. Nach Fixation der Zellen mit Roti-Histofix wurden Aufnahmen der Zellen zum Zeitpunkt nach 45-minütiger IFN γ -Stimulation sowie nach 60-, 120- und 180-minütiger Staurosporin-Inkubation angefertigt.

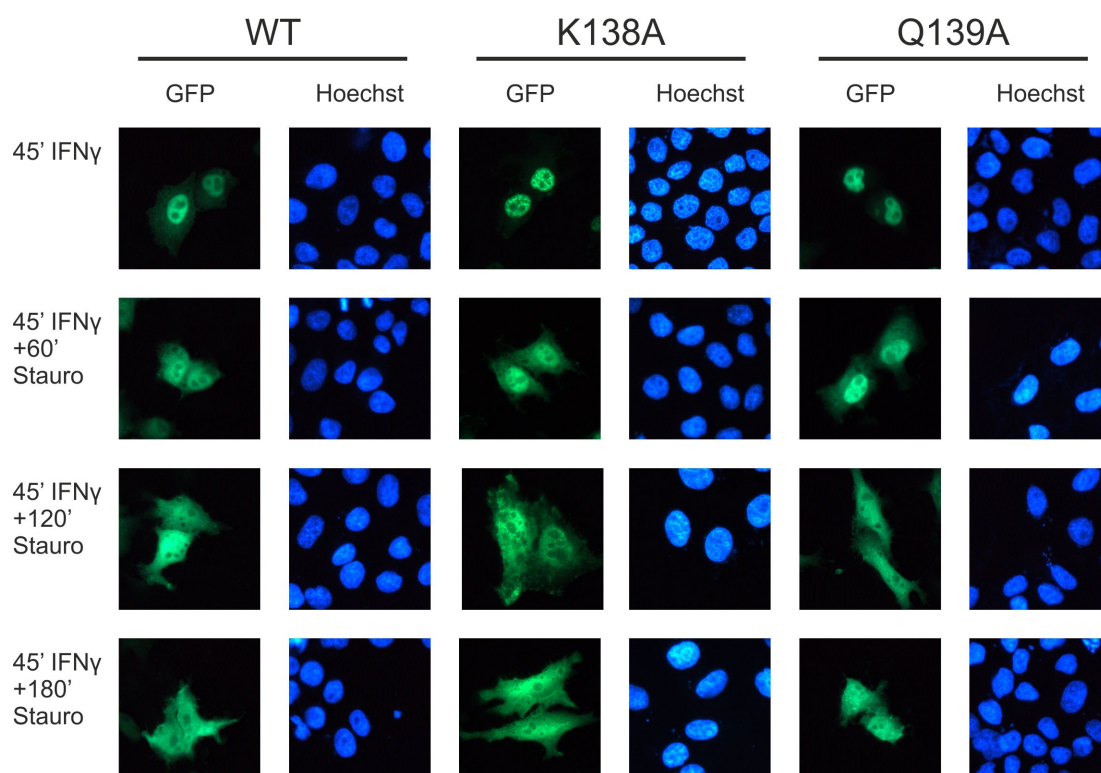


Abb. 4: Die Mutanten K138A und Q139A zeigen die gleiche intrazelluläre Verteilung wie der Wildtyp.

Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen zeigen Zellen, die in gleicher Weise wie in Abb. 3 beschrieben, behandelt wurden. Es zeigte sich bei den untersuchten Mutanten eine starke Kernakkumulation der GFP-markierten STAT1-Proteine nach Interferon- γ -Stimulation sowie eine schnelle Neuverteilung in der Zelle nach Inkubation mit dem Kinasehemmer Staurosporin. Eine auffällige Abweichung der Verteilung der Mutanten verglichen mit dem Wildtyp konnte nicht festgestellt werden.

Bei regelrechter Proteinfunktion ist nach Stimulation durch Interferon eine reversible Kernakkumulation von STAT1 mit nachfolgender Wiedererlangung des prästimulierten Ausgangszustandes der nukleozytoplasmatischen Verteilung nach Beendigung der Phosphorylierung durch Zugabe von Staurosporin zu erwarten. Bei Vorliegen eines Phosphorylierungsdefektes dürfte es zu keiner Kernakkumulation kommen, wobei als Folge eines Dephosphorylierungs- oder nukleären Exportdefektes eine persistierende Kernakkumulation zu beobachten sein sollte.

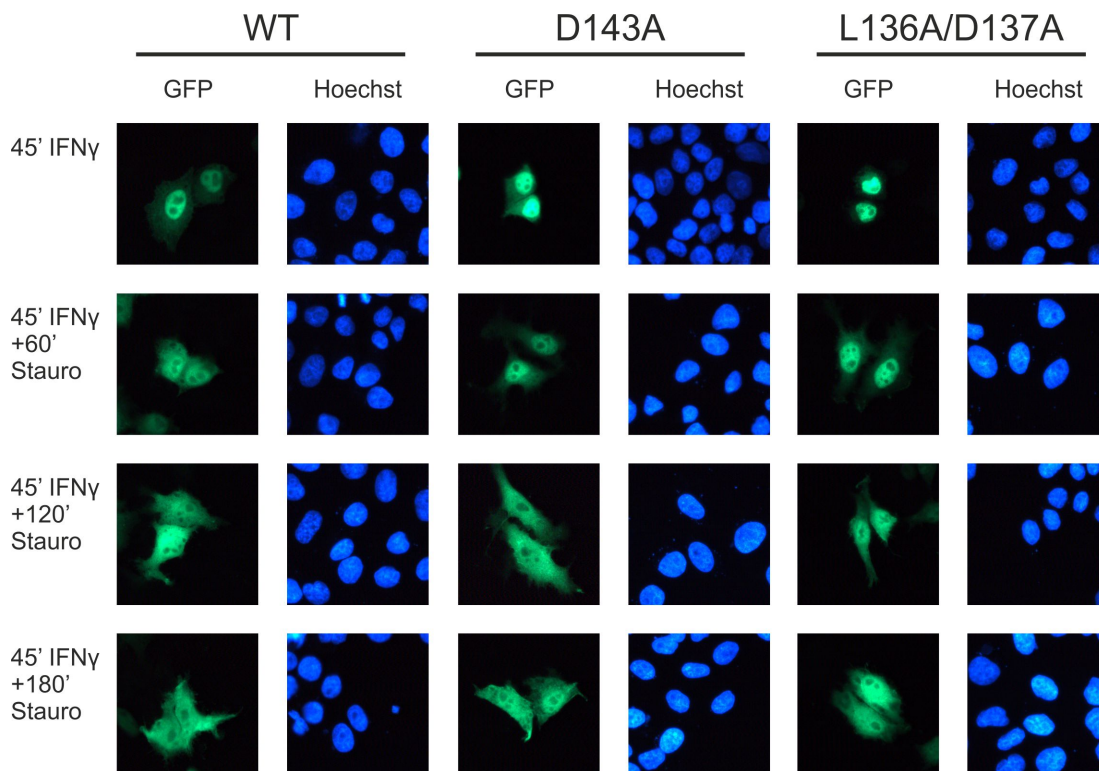


Abb. 5: Die intrazelluläre Umverteilung der Mutanten D143A und L136A/D137A nach Interferonstimulation entspricht der des Wildtyps.

Die gezeigten Zellen wurden wie in Abb. 4 beschrieben mit IFN γ stimuliert und ggf. im Anschluss unterschiedlich lang mit dem Kinaseinhibitor Staurosporin inkubiert. Die Aufnahmen zeigen eine intakte Kernakkumulation nach IFN γ -Stimulation der beiden Mutanten sowie einen dem Wildtyp entsprechenden Zusammenbruch der Kernakkumulation nach Inkubation mit Staurosporin.

Mit Hilfe der gezeigten fluoreszenzmikroskopischen Versuche unter Verwendung von GFP-markierten STAT1-Proteinen konnte die Kerntranslokation von STAT1 nach Stimulation durch Interferon- γ sowie der konsekutive Verlust des kernakkumulierten Zustandes als Folge einer Inkubation mit Staurosporin der STAT1-Mutanten L136A, D137A, K138A, Q139A, D143A und L136A/D137A mit denen des STAT1-Wildtyp-Moleküls verglichen werden. Alle untersuchten Mutanten ließen hier eine dem Wildtyp entsprechende schnelle Akkumulation von STAT1 im Zellkern unter Interferon- γ -Stimulation erkennen. Bei anschließender Inkubation mit Staurosporin zeigten alle Mutanten wie auch der Wildtyp eine gleichmäßige Aufhebung der Kernakkumulation.

5.3 Immunzytochemische Analyse der Kinetik der Kernakkumulation von STAT1-Proteinen

Um einen Einfluss der Fusion des grün-fluoreszierenden-Proteines auf die intrazelluläre Verteilung von STAT1 auszuschließen, wurden die fluoreszenzmikroskopischen Versuche mit unmarkierten STAT1-Proteinen wiederholt.

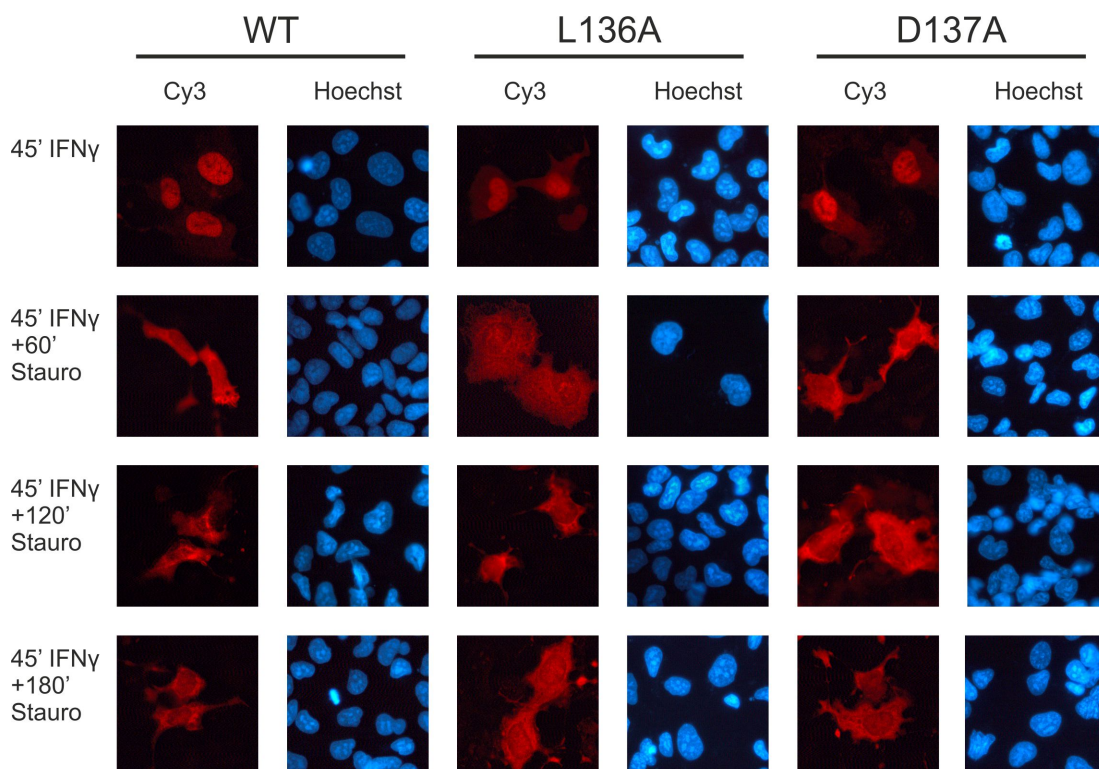


Abb. 6: Die STAT1-Mutanten L136A und D137A unterscheiden sich in der immunzytochemischen Analyse ihrer Kernakkumulation nicht vom Wildtyp.

In humane U3A-Zellen wurden pcDNA3-Plasmide, die für den Wildtyp bzw. die STAT1-Mutanten L136A und D137A kodieren, transfiziert. Die Zellen wurden anschließend für 45 Min. mit Interferon- γ stimuliert und wie angegeben ggf. für 60, 120 oder 180 Min. mit Staurosporin behandelt, bevor sie fixiert und immunzytochemisch angefärbt wurden. Die Aufnahmen sind jeweils bei einer Wellenlänge von 550 nm zur Anregung der rot leuchtenden, sekundären Antikörper sowie bei einer Wellenlänge von 280 nm zur Anregung des zur Kernfärbung genutzten Hoechst-Farbstoffes angefertigt. Man erkennt eine starke Konzentrierung der STAT1-Moleküle im Zellkern nach IFN γ -Stimulation sowohl bei STAT1-Wildtyp als auch bei den durch Mutation veränderten Proteinen. Nach Behandlung der Zellen mit Staurosporin traten STAT1-Proteine wieder aus dem Zellkern aus und verteilten sich panzellulär.

Für diese Experimente wurde die humane U3A-Zelllinie verwendet. Diese Zellen exprimieren kein endogenes STAT1, sodass es sich bei jeglicher STAT1-Immunreaktivität, die in den Zellen gefunden wird, um rekombinant exprimiertes STAT1 handeln muss. In diesen Zellen wurden pcDNA3-Plasmide, die für unmarkierten Wildtyp oder die zu untersuchenden Mutanten von STAT1 kodieren, durch Transfektion zur Expression gebracht. Im Anschluss wurden die Zellen mit Interferon- γ stimuliert sowie mit Staurosporin behandelt. Um die STAT1-Proteine zu detektieren und ihre intrazelluläre Verteilung zu untersuchen, wurden sie immunzytochemisch angefärbt. Dies geschah durch einen primären Antikörper, der selektiv an STAT1-Proteine bindet, und einen sekundären Antikörper, der den primären, STAT1-gebundenen Antikörper erkennt und selbst aufgrund der Anwesenheit

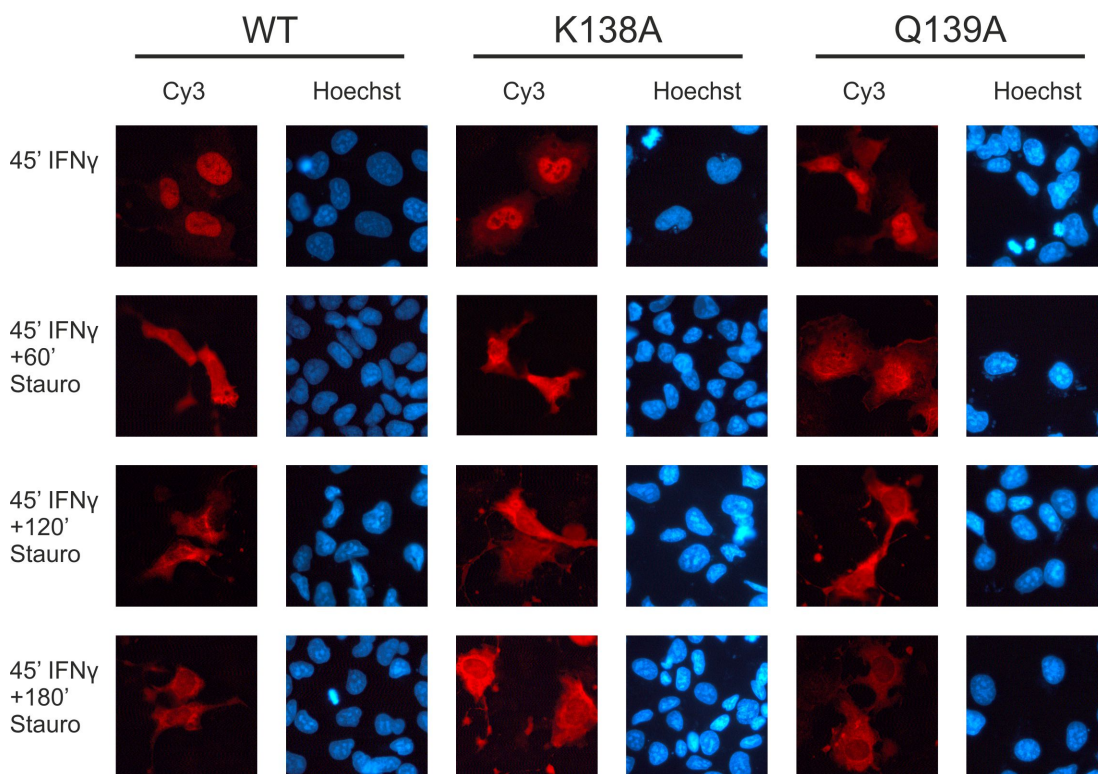


Abb. 7: Die Kinetik der intrazellulären Verteilung der Mutanten K138A und Q139A unterscheidet sich in der immunzytochemischen Untersuchung nicht vom Wildtyp.

Die gezeigten U3A-Zellen wurden mit STAT1-Wildtyp sowie den Mutanten K138A und Q139A kodierenden Plasmiden transfiziert und wie in Abb. 6 beschrieben stimuliert. Es lässt sich kein Unterschied zwischen Wildtyp und Mutanten in der Kernakkumulation der Proteine nach Interferon- γ -Stimulation sowie in der Umverteilung der Proteine in der Zelle nach Staurosporin-Inkubation feststellen.

eines Chromophors über fluoreszierende Eigenschaften verfügt. Mit dem Fluoreszenzmikroskop konnten die Präparate digital aufgenommen werden.

Die durchgeführten Versuche zeigten eine regelgerechte Akkumulation von STAT1 im Kern nach Interferon- γ -Stimulation sowie einen Zusammenbruch der Kernakkumulation nach Behandlung der Zellen mit Staurosporin, sowohl bei STAT1-Wildtyp als auch bei den untersuchten Mutanten. Ein Einfluss der GFP-Markierung auf die Kinetik der Kernakkumulation der STAT1-Mutanten konnte auf diese Weise ausgeschlossen werden. Es ergibt sich aus diesen Experimenten folglich kein Hinweis auf eine Funktionsstörung der durch Mutation veränderten STAT1-Proteine.

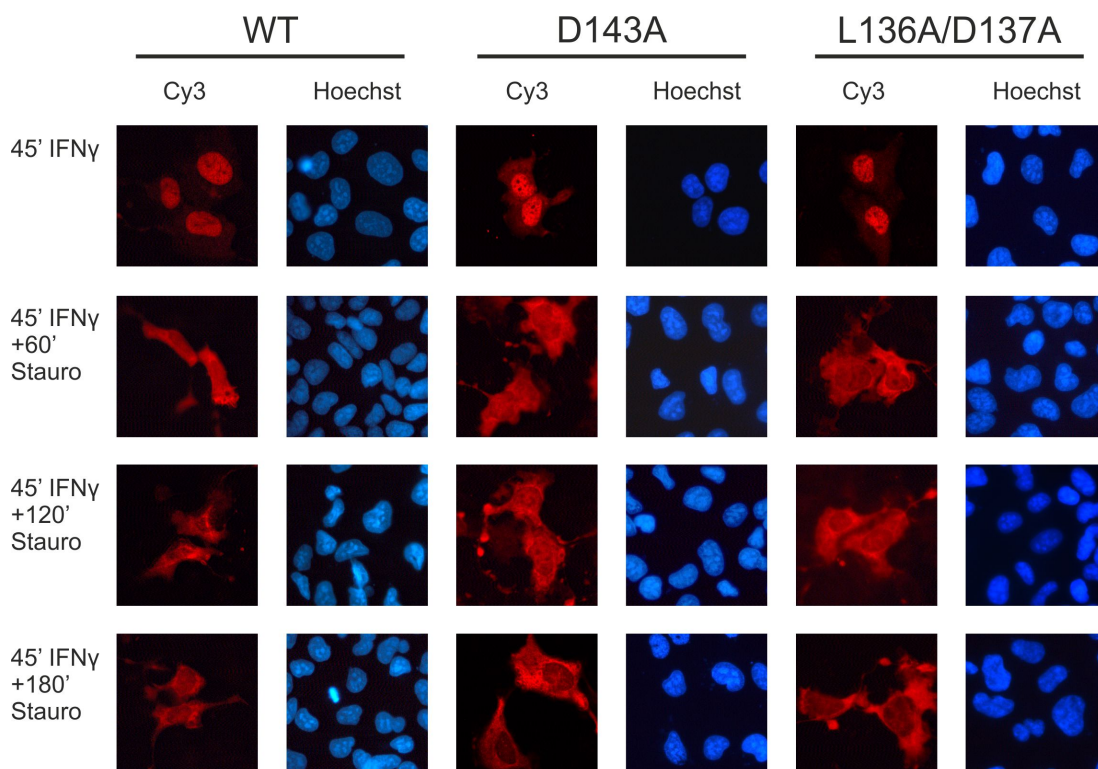


Abb. 8: Immunzytochemisch lässt sich kein Unterschied in der Kernakkumulation der Mutanten D143A und L136A/D137A und der des Wildtyps feststellen.

In die hier untersuchten U3A-Zellen wurden Plasmide, die den Wildtyp und die STAT1-Mutanten D143A und L136A/D137A exprimieren, durch Transfektion eingebracht. Anschließend wurden die Zellen wie in Abb. 6 beschrieben behandelt. Die untersuchten Mutanten zeigen eine regelrechte Akkumulation der STAT1-Moleküle im Zellkern nach Interferon- γ -Stimulation und einen schnellen Zusammenbruch der Kernakkumulation als Folge der Behandlung mit dem Kinaseinhibitor Staurosporin. Ein vom STAT1-Wildtyp abweichendes Verhalten der Mutanten lässt sich in diesen Experimenten nicht nachweisen.

5.4 Phosphorylierungsassays

In weiteren Experimenten wurde untersucht, wie stark die Phosphorylierung der STAT1-Mutanten als Reaktion auf Stimulation der Zellen mit Interferon- γ ausfällt und inwiefern diese Phosphorylierung nach Beendigung der Stimulation wieder abklingt. Hierzu wurden zunächst Plasmide mit GFP-markierten STAT1-Mutanten oder markiertem STAT1-Wildtyp in humane HeLa-S3-Zelllinien transfiziert. Die Zellen wurden anschließend entweder nur für 45 Min. mit Interferon- γ stimuliert oder der Stimulation folgend für 15, 30 oder 45 Min. mit Staurosporin inkubiert. Die so behandelten Zellen wurden anschließend lysiert, die Ganzzelllextrakte in einem Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und auf Membranen gebロットet. Mit Hilfe spezifischer Antikörper gegen phosphoryliertes STAT1 konnte dieses detektiert und die vorhandene Menge abgebildet werden. Um eine abweichende Verteilung an gesamten STAT1-Proteinen auszuschließen, wurde die Detektion nach Abwaschen der Phospho-STAT1-Antikörper mit Antikörpern gegen STAT1, die nicht von der Phosphorylierung des Proteins abhängig sind, wiederholt. Die in diesem Experiment verwendeten HeLa-S3-Zellen exprimieren neben den rekombinanten STAT1-Proteinen zusätzlich endogenes STAT1. Da dieses aufgrund des geringeren Molekulargewichtes ein abweichendes gelelektrophoretisches Laufverhalten aufweist, lässt sich dieses im Western-Blot leicht von den GFP-markierten STAT1-Proteinen unterscheiden. In den abgebildeten Ausschnitten stellt es jeweils die untere Bande dar.

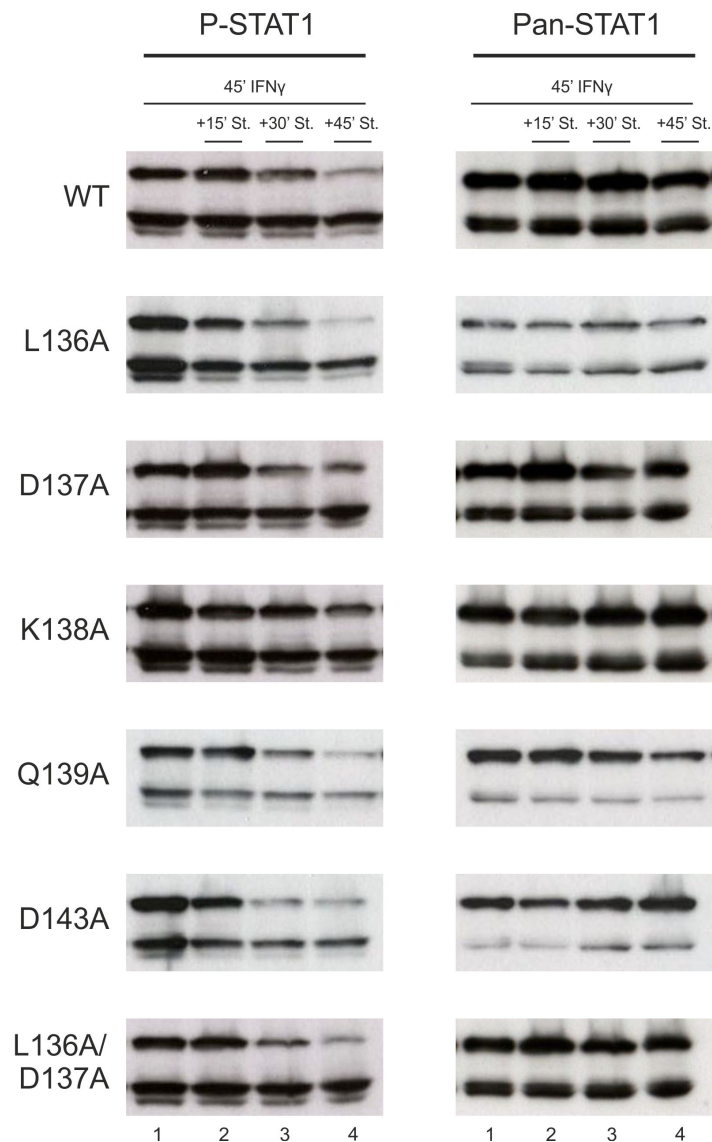


Abb. 9: Das Phosphorylierungsniveau der untersuchten STAT1-Mutanten unterscheidet sich nicht von dem des Wildtyps.

Gezeigt sind Ausschnitte aus Western-Blots vom Wildtyp (WT) und den untersuchten Mutanten. Aufgetrennt wurden Extrakte aus HeLa-Zellen, die entweder nur für 45 Min. (Spalte 1) mit Interferon- γ stimuliert wurden oder zusätzlich im Anschluss für 15 Min. (Spalte 2), 30 Min. (Spalte 3) oder 45 Min. (Spalte 4) mit Staurosporin inkubiert wurden. Die Proteine wurden mittels Antikörpern gegen Tyrosin-phosphoryliertes STAT1 (P-STAT1) sowie gegen gesamtes STAT1 (Pan-STAT1) detektiert. Die jeweils obere Bande zeigt das transfizierte GFP-STAT1-Fusionsprotein, die jeweils untere den endogen in den Zellen exprimierten STAT1-Wildtyp. Die Untersuchungen zeigen eine starke Phosphorylierung der Zellen nach IFN γ -Stimulation, die nach Inkubation mit Staurosporin langsam abklingt. Der Kontrollversuch mit Pan-STAT1-Antikörper zeigt, dass sich die vorhandene Menge STAT1 nicht wesentlich unterscheidet.

Mit Hilfe der Phosphorylierungsassays ließen sich für alle untersuchten Mutanten eine dem Wildtyp entsprechende, starke Phosphorylierung nach Stimulation der Zellen mit Interferon- γ nachweisen. Nach Beendigung der Stimulation und Inkubation der Zellen mit Staurosporin kommt es zu einer Abnahme des Anteils an phosphoryliertem STAT1. Dies lässt sich sowohl bei dem STAT1-Wildtyp als auch bei den untersuchten Mutanten nachweisen. Während der Anteil an phosphoryliertem STAT1 im zeitlichen Verlauf abnimmt, bleibt die Menge an gesamtem STAT1 konstant. Ein Einfluss der Gesamtmenge auf das Signal des phosphorylierten STAT1 liegt somit nicht vor. In Abb. 9 sind Ausschnitte von Scans der durch Chemilumineszenz geschwärzten Filme für jede Mutante sowie für den Wildtyp abgebildet. Die Ergebnisse zeigen, dass der Mechanismus der Zytokin-vermittelten Phosphorylierung der STAT1-Mutanten intakt ist. Durch die Mutationen kommt es weder zu einer Hyperphosphorylierung noch zu einem Dephosphorylierungsdefekt oder einer verminderten Phosphorylierung.

5.5 EMSA-Experimente

Die DNA-Bindefähigkeit der STAT1-Mutanten wurde mit Hilfe von Gelshift-Assays untersucht. Für diese Experimente wurden zunächst Plasmide, die für die zu untersuchenden Mutanten oder für den STAT1-Wildtyp kodieren, in humane U3A-Zelllinien eingebracht. Nach 45-minütiger Stimulation mit Interferon- γ wurden die Zellen lysiert und Ganzzellextrakte hergestellt. Anschließend wurden die Extrakte zusammen mit radioaktiv markierten DNA-Sonden inkubiert und ihr Laufverhalten in einem Polyacrylamid-Gel beurteilt. Hierzu wurden Sonden mit einer GAS-Bindestelle (M67), einer GAS-Bindestelle gefolgt von einer degenerierten GAS-Bindestelle (GAS-nonGAS) sowie mit zwei aufeinander folgenden, degenerierten GAS-Bindestellen (2xnon-GAS) eingesetzt. Zusätzlich wurde bei jedem Versuch ein Supershift mit dem STAT1-Antikörper α S1 sowie zur Kontrolle mit dem STAT3-Antikörper α S3 durchgeführt.

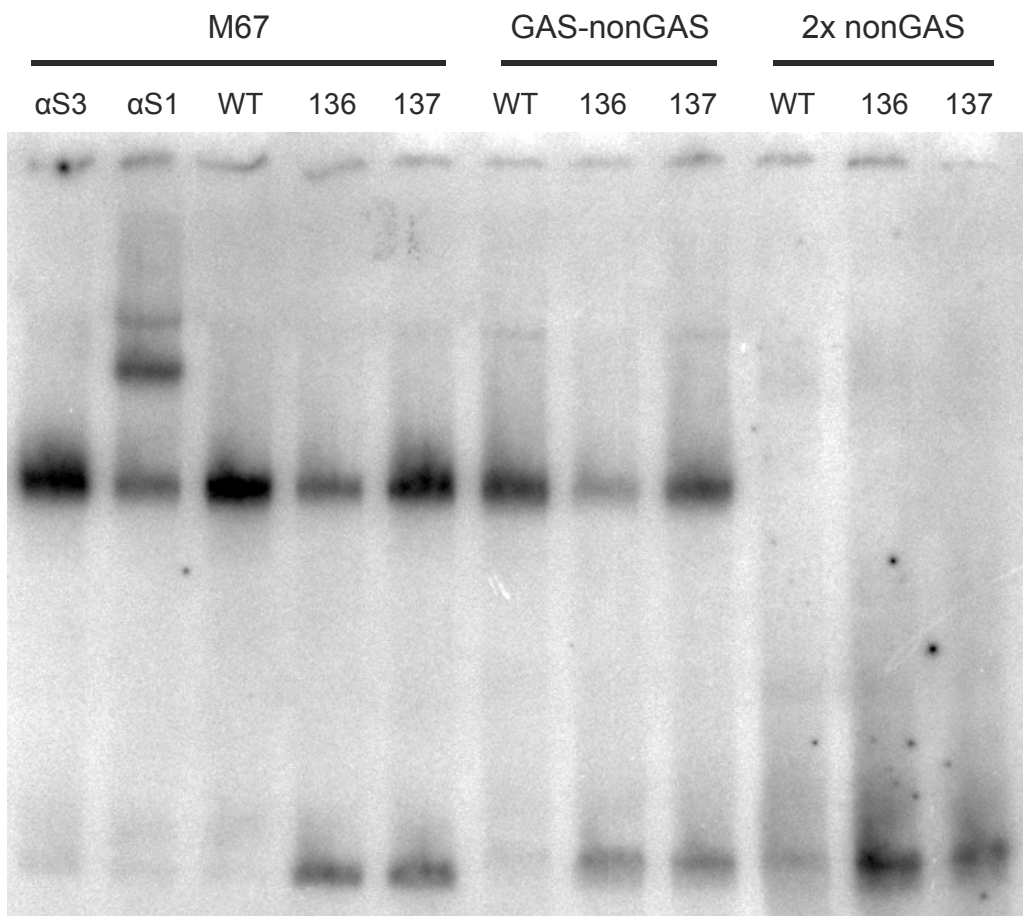


Abb. 10: Die Mutanten L136A und D137A zeigen eine mit dem Wildtyp vergleichbare DNA-Bindeaffinität.

Für den hier gezeigten Versuch wurden Ganzzelextrakte von IFN γ -stimulierten U3A-Zellen mit den radioaktiv-gelabelten Sonden M67, GAS-nonGAS und 2xnonGAS inkubiert und anschließend in einem Gel aufgetrennt. Sowohl die untersuchten Mutanten L136A und D137A als auch der Wildtyp zeigen in diesem Experiment eine starke Bindung an die Sonde M67, eine geringere Bindung an die Sonde GAS-nonGAS und keine detektierbare Bindung an die Sonde 2xnonGAS. In der zweiten Spur ist ein Supershift mit dem STAT1-Antikörper α S1 aufgetragen. Durch eine Verschiebung der Bande nach oben konnte gezeigt werden, dass es sich bei der dargestellten Bande um Komplexe aus STAT1 und der Sonde handelt. Der in der ersten Bahn aufgetragene STAT3-Antikörper α S3 dient als Negativkontrolle und führt nicht zu einem Shift der STAT1-Bande.

Mit Hilfe des Supershifts mit dem STAT1-Antikörper C24 ließ sich beweisen, das es sich bei den dargestellten Banden tatsächlich um Komplexe aus STAT1-Proteinen und den radioaktiv-markierten DNA-Sonden handelt. Der STAT1-Antikörper bindet zusätzlich an die STAT1-DNA-Komplexe und bildet mit ihnen noch größere Komplexe, die in der Gelelektrophorese langsamer laufen und so eine nach oben verschobene Bande bilden. Ein als Negativkontrolle zugegebener STAT3-Antikörper α S3 bindet dagegen nicht an die STAT1-DNA-Komplexe und führt deshalb nicht zu einem Bandenshift.

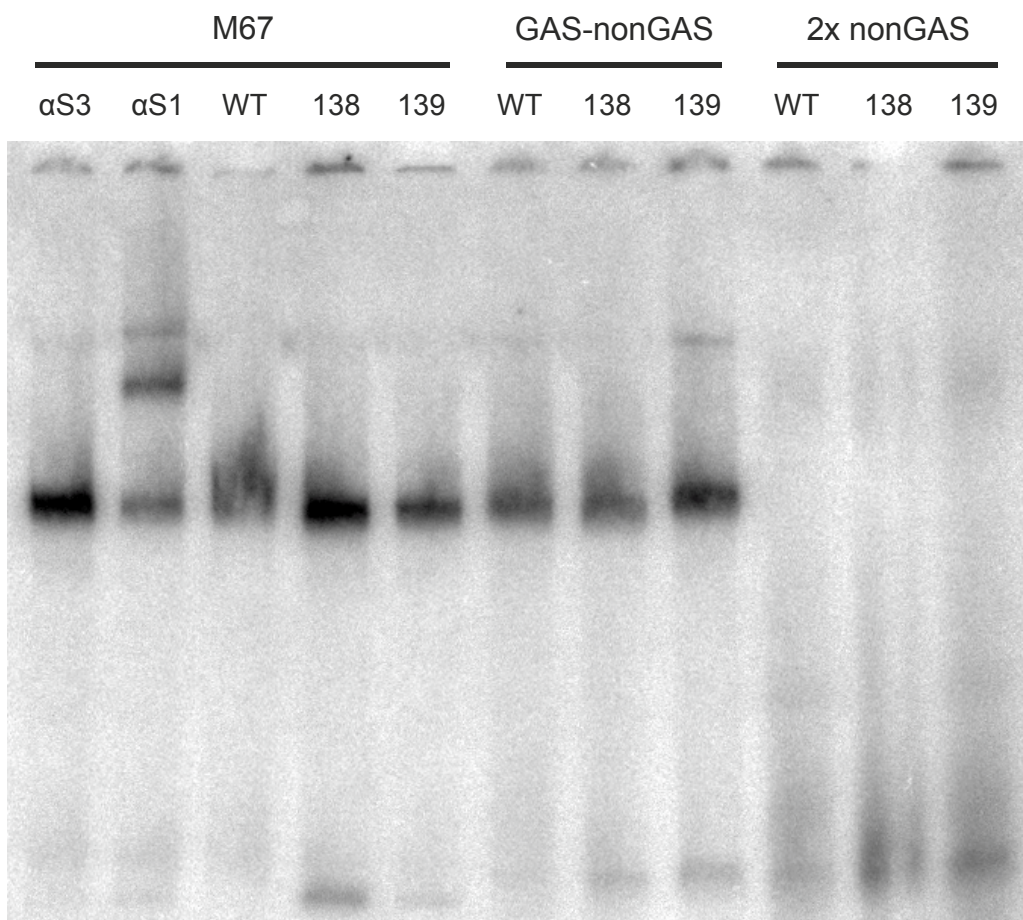


Abb. 11: Die Fähigkeit zur DNA-Bindung der Mutanten K138A und Q139A gleicht der des Wildtyps

Im gezeigten Gelretardationsexperiment wurde die DNA-Bindung der Mutanten K138A und Q139A mit der des Wildtyps verglichen. Hierzu wurden Ganzzelextrakte zusammen mit den Sonden M67, GAS-nonGAS und 2xnonGAS aufgetragen. Die erste Bande zeigt eine Kontrolle mit α S3, die zweite einen Supershift mit α S1. Beide Mutanten sowie der Wildtyp zeigen eine starke Bindung an die Sonde M67, eine leicht geringere Bindung an die Sonde GAS-nonGAS sowie keine sichtbare Bindung an die Sonde 2xnonGAS. Ein deutlicher Unterschied zwischen Mutanten und Wildtyp zeigt sich nicht.

Bei erhaltener Funktion der Mutanten ist eine starke Bindung der Proteine an die Sonde M67, die eine einzelne GAS-Bindestelle enthält, zu erwarten. Diese stellt sich im Gelshift als deutliche Bande durch den Komplex aus STAT1 und DNA-Sonde dar. An die Sonde GAS-nonGAS ist eine ebensolche Bindung zu erwarten, markiert durch ein vergleichbares Signal der Bandenintensität im Gelshift. Die Sonde 2xnonGAS mit zwei einander folgenden degenerierten GAS-Bindestellen sollte bei korrekter Proteinfunktion nicht spezifisch gebunden werden und im Gelshift kein entsprechendes Signal zeigen.

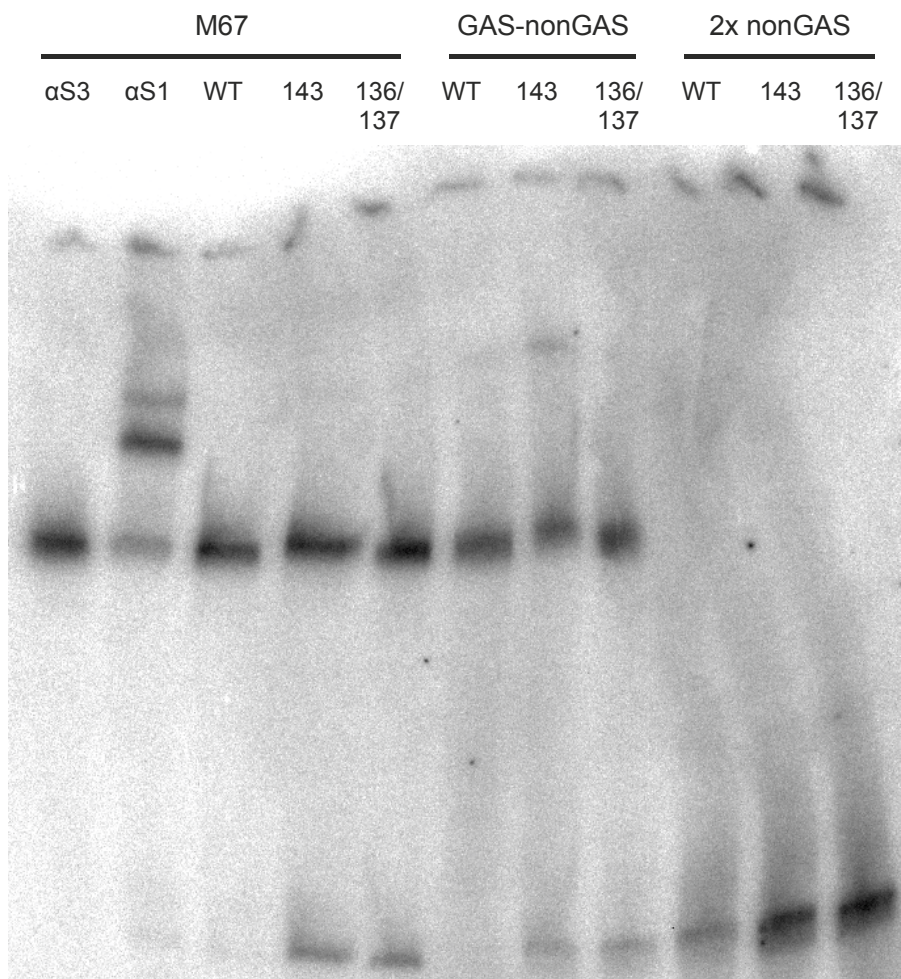


Abb. 12: Die Mutanten D143A und L136A/D137A weisen eine erhaltene, spezifische DNA-Bindeaffinität auf.

In diesem Experiment wurde die DNA-Bindung der Mutanten D143A und L136A/D137A im Vergleich zum Wildtyp überprüft. Hierzu wurden Ganzzellextrakte zusammen mit den Sonden M67, GAS-nonGAS und 2xnonGAS im Gelshift aufgetrennt. Die erste Spur zeigt eine Kontrolle mit dem STAT3-Antikörper α S3, die zweite einen Supershift mit dem STAT1-Antikörper α S1. Die Mutanten weisen eine erhaltene Bindung an die Sonde M67, eine abgeschwächte Bindung an GAS-nonGAS und keine Bindung an 2xnonGAS auf.

Die durchgeführten Experimente zeigten für alle untersuchten Mutanten eine erhaltene, starke Bindung an die Sonde M67, eine geringere Bindung an die Sonde GAS-nonGAS sowie keine spezifische Bindung an die Sonde 2xnon-GAS. Ein Unterschied zum DNA-Bindeverhalten des STAT1-Wildtyps ließ sich hier nicht demonstrieren.

Darüber hinaus wurde die Stabilität der einmal erfolgten DNA-Bindung der untersuchten Mutanten durch Konkurrenzexperimente untersucht. Dabei wurden Zellextrakte in oben beschriebener Weise hergestellt und mit der zwei aufeinander folgende GAS-Bindestellen enthaltenden DNA-Sonde 2xGAS inkubiert. Anschließend wurde bei einem Teil der Proben unmarkierte M67-DNA im Überschuss zugegeben und nach weiterer Inkubation für jede Mutante jeweils eine Probe mit und ohne zugegebener M67-DNA im Polyacrylamid-Gel aufgetrennt. Zudem wurde auch hier ein Supershift mit den Antikörpern α S1 und α S3 durchgeführt.

Für den Wildtyp und die Mutanten ist ohne die Zugabe von unmarkierter M67-DNA die Bildung einer Bande bestehend aus DNA-gebundenen STAT1-Tetrameren als auch eine zweite Bande aus DNA-gebundenen STAT1-Dimeren zu erwarten. Die STAT1-Dimere bewegen sich aufgrund ihrer geringeren Größe im Polyacrylamid-Gel schneller und bilden daher die untere Bande. Bei Proben mit Konkurrenz durch im 750-fachen molaren Überschuss zugegebene, unmarkierte M67-DNA sollte die obere Bande aufgrund der großen Stabilität der DNA-Bindung durch STAT1-Tetramere erhalten bleiben. Angesichts der hohen Dissoziationsrate der STAT1-Dimere von DNA sollte die markierte DNA-Sonde jedoch durch die im Überschuss vorhandene, unmarkierte Sonde aus der STAT1-Dimer-Bindung verdrängt worden sein. Im Bandenmuster ist demzufolge ein Verlust der Dimerbande unter Konkurrenzbedingungen zu erwarten.

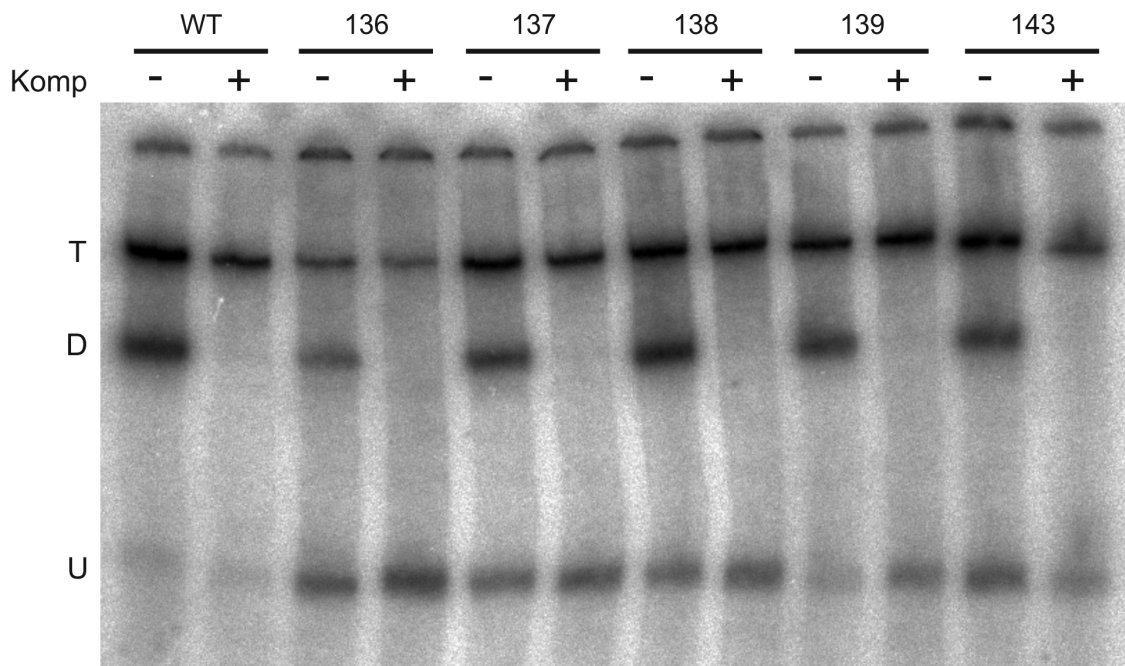


Abb. 13: Die Stabilität der DNA-Bindung durch die Mutanten L136A, D137A, K138A, Q139A und D143A ist erhalten.

Im gezeigten Experiment wurde die Stabilität der DNA-Bindung von STAT1-Dimeren und -Tetrameren untersucht. Hierzu wurden Ganzzellextrakte mit der markierten Sonde 2xGAS inkubiert und in den mit - gekennzeichneten Spuren aufgetragen. Zusätzlich wurden die Extrakte mit unmarkierter M67-Sonde inkubiert und in den mit + markierten Spuren aufgetragen. Bei allen Proben zeigte sich eine Bande aus STAT1-Tetrameren (T). Bei den Spuren ohne Konkurrenz durch unmarkierte M67-DNA (-) stellte sich zudem eine Bande bestehend aus STAT1-Dimeren dar. Nach erfolgter Konkurrenz (+) wird die markierte Sonde aus ihrer Bindung zu den STAT1-Dimeren gedrängt, sodass sich hier die STAT1-Dimere nicht darstellen.

Die durchgeführten Versuche zeigten für den Wildtyp und alle untersuchten Mutanten übereinstimmende Ergebnisse. Ohne Konkurrenz durch unmarkierte, GAS-Sequenzen enthaltende DNA stellten sich in allen Versuchen Banden für STAT1-Tetramere sowie für STAT1-Dimere dar. Nach erfolgter Zugabe von unmarkierter M67-DNA im hohen molaren Überschuss ließ sich die Bande der STAT1-Dimere nicht mehr nachweisen. Die Bande der STAT1-Tetramere blieb dagegen erhalten. Im zusätzlich durchgeführten Supershift mit den Antikörpern α S1 und α S3 wurde die Identität der Banden bestätigt.

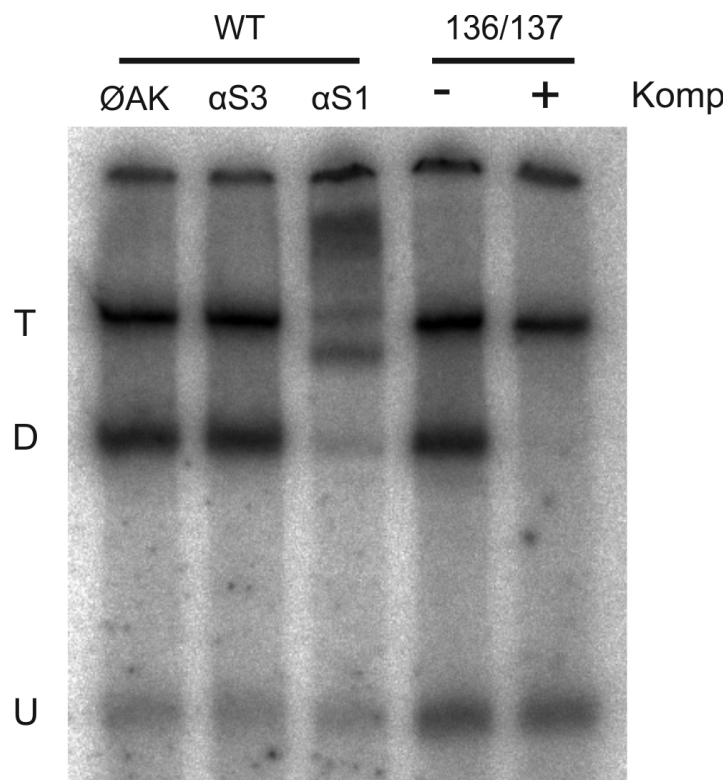


Abb. 14: Die Mutante L136A/D137A zeigt eine mit dem Wildtyp übereinstimmende Stabilität der DNA-Bindung.

Zur Überprüfung der Stabilität der DNA-Bindung durch die Mutante L136A/D137A wurden Ganzzelextrakte mit der markierten Sonde 2xGAS inkubiert und in den mit - bezeichneten Spuren aufgetragen. Zusätzlich wurden die Extrakte mit der unmarkierten M67-Sonde im 750-fachen molaren Überschuss inkubiert und in der Spalte + aufgetragen. Auch hier zeigte die Spalte - sowohl Banden durch STAT1-Tetramere als auch durch STAT1-Dimere. Die Spalte + dagegen zeigt nur die Bande durch STAT1-Tetramere. STAT1-Dimere zeichnen sich aufgrund der verdrängten, markierten DNA-Sonde hier nicht ab. Zusätzlich ist hier ein Supershift mit dem STAT3-Antikörper (α S3) sowie mit dem STAT1-Antikörper (α S1) aufgetragen. Dieser zeigt durch einen Bandenshift bei dem Antikörper α S1, dass es sich bei den untersuchten Banden um Komplexe aus STAT1 handelt. Der Antikörper α S3 vermag dagegen keinen Supershift zu bewirken.

5.6 Reporter-Gen-Assays

Um die transkriptionelle Aktivität der STAT1-Mutanten zu bestimmen, wurden Reporter-Gen-Assays durchgeführt. Hierfür wurden zum einen konstitutiv STAT1-exprimierende Vektoren und zum anderen Plasmide, die STAT1-ab-

hängig Luciferase sowie STAT1-unabhängig β -Galactosidase exprimieren, in U3A-Zellen eingebracht. Die transfizierten Zellen wurden anschließend entweder sechstündig mit IFN γ stimuliert oder aber unstimuliert belassen. Lysate dieser Zellen konnten nun auf die Menge der gebildeten Luciferase sowie auf die Aktivität der β -Galactosidase untersucht werden. Zur graphischen Darstellung wurde die Aktivität der Luciferase auf die Stärke der β -Galactosidase-Reaktion normiert, um den Einfluss unterschiedlicher Zelldichten und abweichender Transfektionseffizienz zu minimieren.

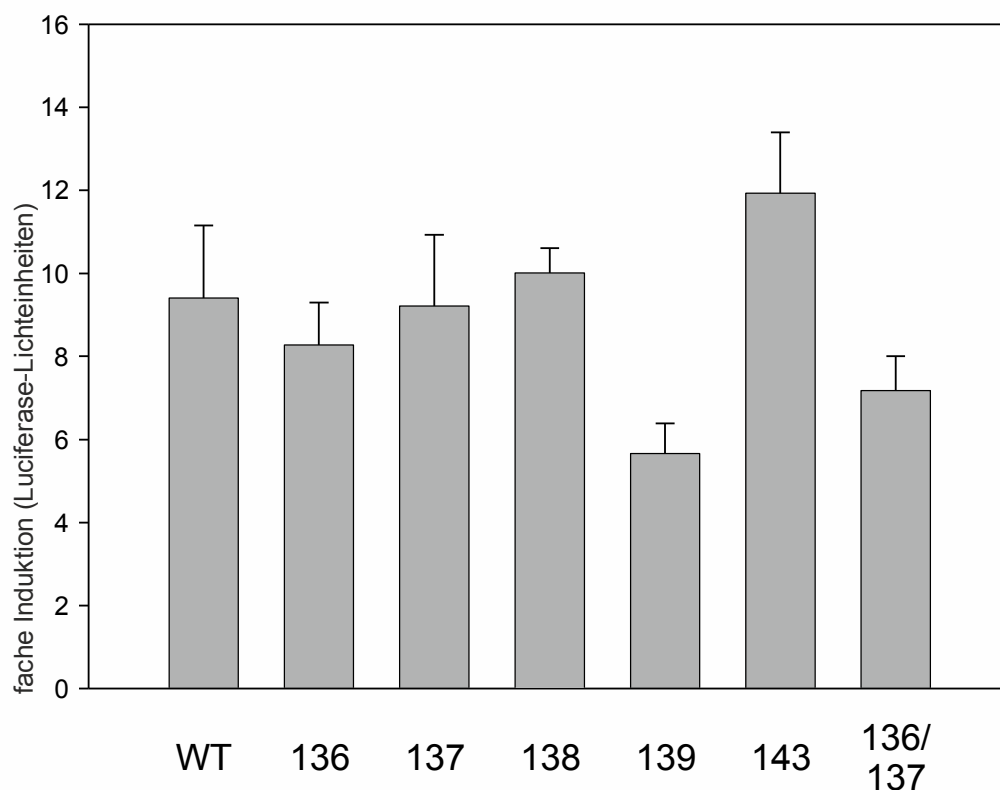


Abb. 15: WT und Mutanten stimulieren die Expression an den Promotor Ly6E gekoppelter Reportergene ohne signifikanten Unterschied.

Die Abbildung vergleicht die Induktion eines Ly6E-gekoppelten Luciferase-Gens durch STAT1-WT und der o.g. Mutanten nach Stimulation mit Interferon- γ . Hierzu wurde die gemessene Luciferase-Aktivität auf die Stärke der eingetretenen β -Galactosidase-Reaktion normiert und die Quotienten der Werte aus IFN- γ stimulierten und unstimulierten Zellen gebildet. Alle untersuchten Mutanten zeigen eine ausgeprägte Steigerung der Luciferase-Expression bei Stimulation mit IFN- γ .

Die Reporter-gen-Untersuchungen wurden zunächst mit dem synthetischen Promotor Ly6E, welcher drei GAS-Bindestellen besitzt, durchgeführt. Zur weiteren Evaluation der transkriptionellen Aktivität wurden die Versuche mit den Fragmenten pIC-339 und pIC-1352 des nativ vorkommenden ICAM1-Promotors wiederholt. Diese beiden Fragmente besitzen jeweils eine singuläre GAS-Bindestelle.

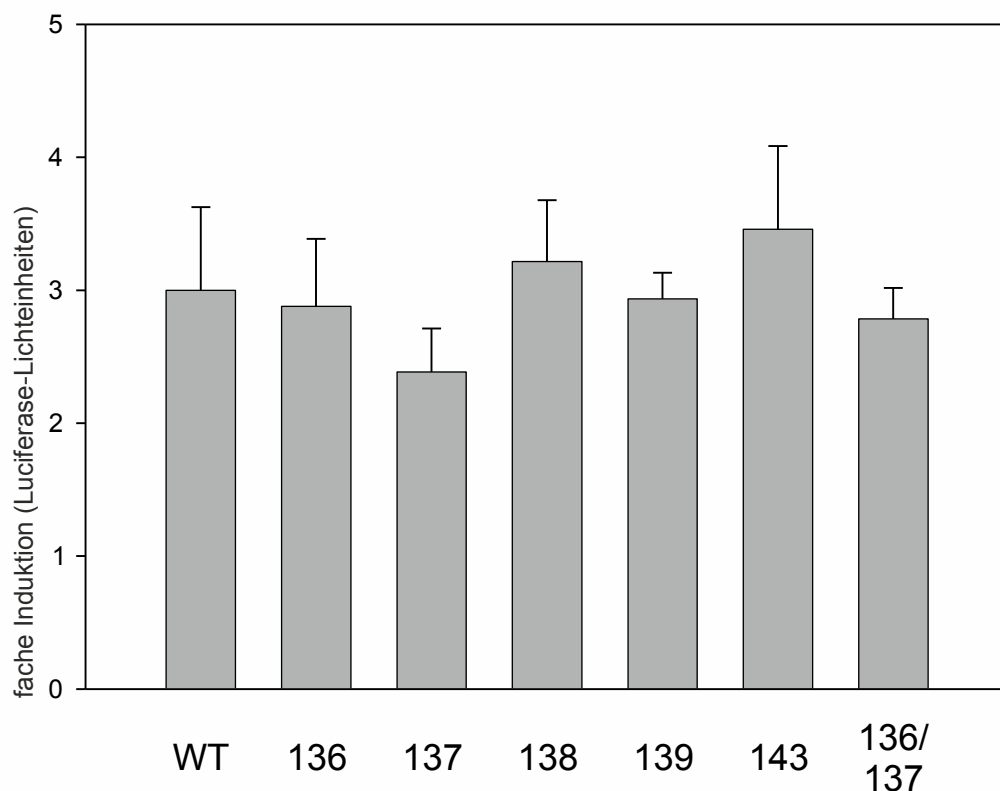


Abb. 16: Der pIC-339-gekoppelte Luciferasereporter wird durch WT und Mutanten gleichermaßen induziert.

Abgebildet ist ein Vergleich der Expression eines pIC-339-gekoppelten Luciferase-Reporters durch STAT1-WT und den angegebenen Punktmutanten. Es wurden dazu entsprechend transfizierte Zellen mit IFN- γ stimuliert und in Zellextrakten die Luciferase-Aktivität bzw. Galactosidase-Reaktion gemessen. Im Diagramm sind die gemittelten Quotienten aus Luciferase-Aktivität bei stimulierten und unstimulierten Zellen aufgetragen. Es zeigt sich hierbei ein gleichmäßiger Anstieg der Luciferase-Reaktion durch Stimulation bei allen untersuchten STAT1-Mutanten.

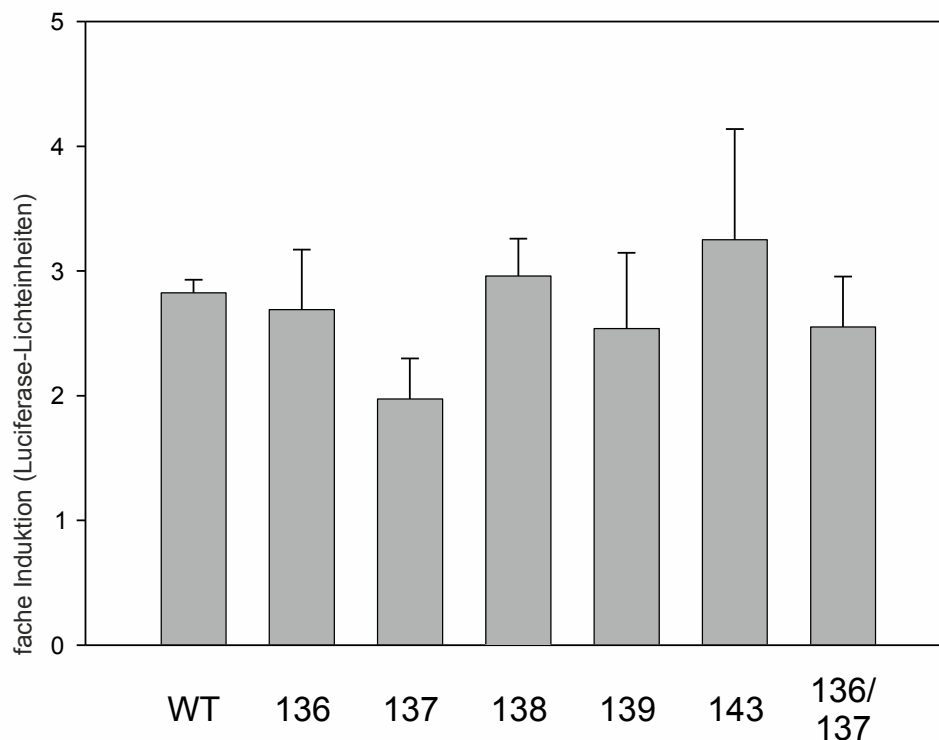


Abb. 17: Ein Vergleich mit dem Promotor pIC-1352 bestätigt das bisherige Ergebnis.

Der hier gezeigte Vergleich der Quotienten aus Luciferase-Aktivität stimulierter bzw. unstimulierter Zellen bestätigt das in Abb. 16 beschriebene Ergebnis. Es findet sich auch hier ein vergleichbarer Anstieg der Luciferase-Expression durch IFN- γ -Stimulation.

Die dargestellten Ergebnisse zeigen sowohl bei Verwendung des synthetischen Promotors Ly6E mit drei GAS-Bindestellen als auch bei den nativen Promotorfragmenten pIC-339 und pIC-1352 eine deutliche Steigerung der Expression der jeweiligen Luciferase-Reporter nach Stimulation der Zellen mit Interferon- γ . Erwartungsgemäß fällt die Expression unter Verwendung des Promotors Ly6E aufgrund der höheren Dichte an GAS-Bindestellen deutlich stärker aus als bei Verwendung der Promotoren mit singulärer GAS-Bindestelle. Ein signifikanter Unterschied in der transkriptionellen Aktivität der untersuchten Mutanten gegenüber der des Wildtyps ließ sich in den Reporter-gen-Analysen nicht nachweisen.

5.7 Realtime-PCR-Analysen

Um die Fähigkeit der untersuchten STAT1-Mutanten zur Induktion von Interferon-regulierten Zielgenen weiter zu untersuchen, wurden Realtime-PCR-Analysen durchgeführt. Dazu wurde sowohl aus IFN γ -stimulierten Zellen als auch aus unstimulierten Zellen die enthaltene RNA extrahiert und hieraus mittels reverser Transkriptase cDNA gewonnen. Aus der hergestellten cDNA der Zellen konnte im Anschluss mittels Realtime-PCR gezielt die Menge der vorkommenden Abschriften der STAT1-Zielgene bestimmt werden und gegen die Menge des konstitutiv exprimierten GAPDH-Gens ausgewertet werden. Für diese Auswertung wurde die Delta-Delta-Ct-Methode nach Pfaffl (2001) verwendet.

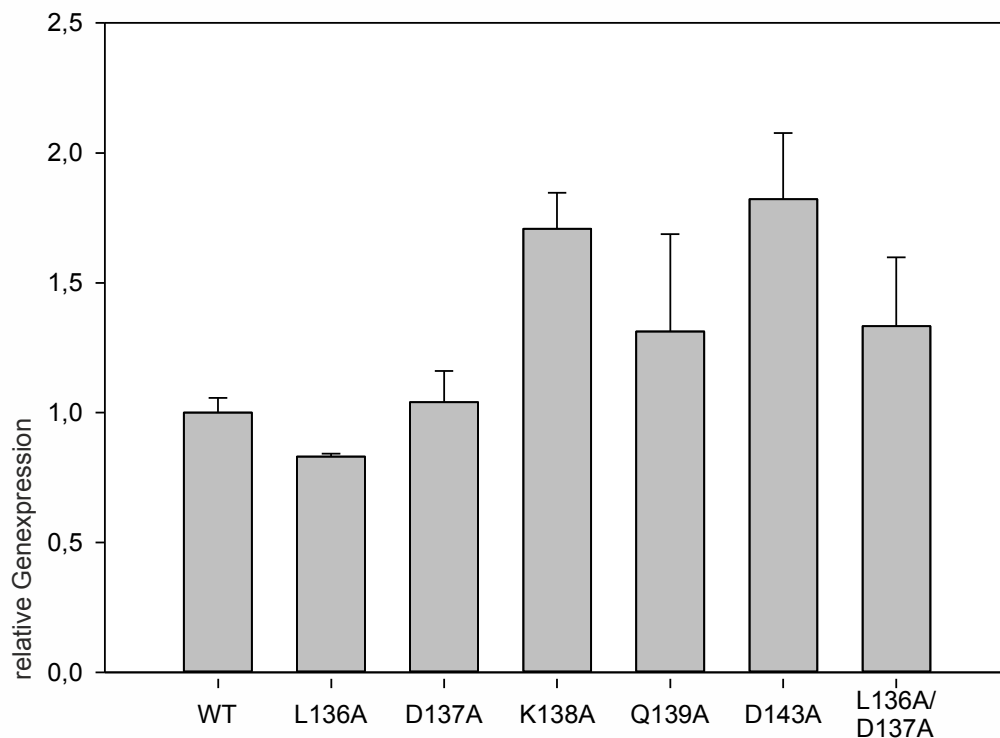


Abb. 18: STAT1-Wildtyp und Mutanten führen zu einer IFN γ -abhängigen Expression des STAT1-Zielgenes *gbp1*.

Das Vorkommen von Gentranskripten des STAT1-Zielgens *gbp1* nach IFN γ -Stimulation in untersuchten STAT1-Mutanten wurde mittels Realtime-PCR bestimmt, auf die Menge des vorhandenen konstitutiv exprimierten Genes *GAPDH* normiert und zum Wildtyp in Verhältnis gesetzt. Während die Mutanten 136, 137, 139 sowie 136/137 eine vergleichbare Genexpression ist die Genexpression durch K138A und D143A erhöht.

Sowohl der Wildtyp als auch alle getesteten Mutanten zeigten nach Stimulation der Zellen mit Interferon- γ einen signifikanten Anstieg der Transkription des STAT1-Zielgenes *gbp1*. Die Mutanten 138, 139 und 143 sowie 136/137 wiesen sogar eine geringfügig stärkere Erhöhung der *gbp1*-Transkription nach Stimulation auf, als dieses bei dem Wildtyp und den Mutanten 136 und 137 zu beobachten war. Abbildung 18 zeigt die graphische Darstellung der Untersuchungsergebnisse für das Zielgen *gbp1*. Ähnliche Ergebnisse zeigten die Untersuchungen der beiden weiteren Zielgene *irf1* und *mig1* die in Abb. 19 und Abb. 20 dargestellt sind. Während das Zielgen *irf1* durch Wildtyp und Mutanten in vergleichbarer Größenordnung induziert wurde, zeigte das Zielgen *mig1* eine gesteigerte Infektion durch die Mutanten K138A, Q139A und L136/D137A.

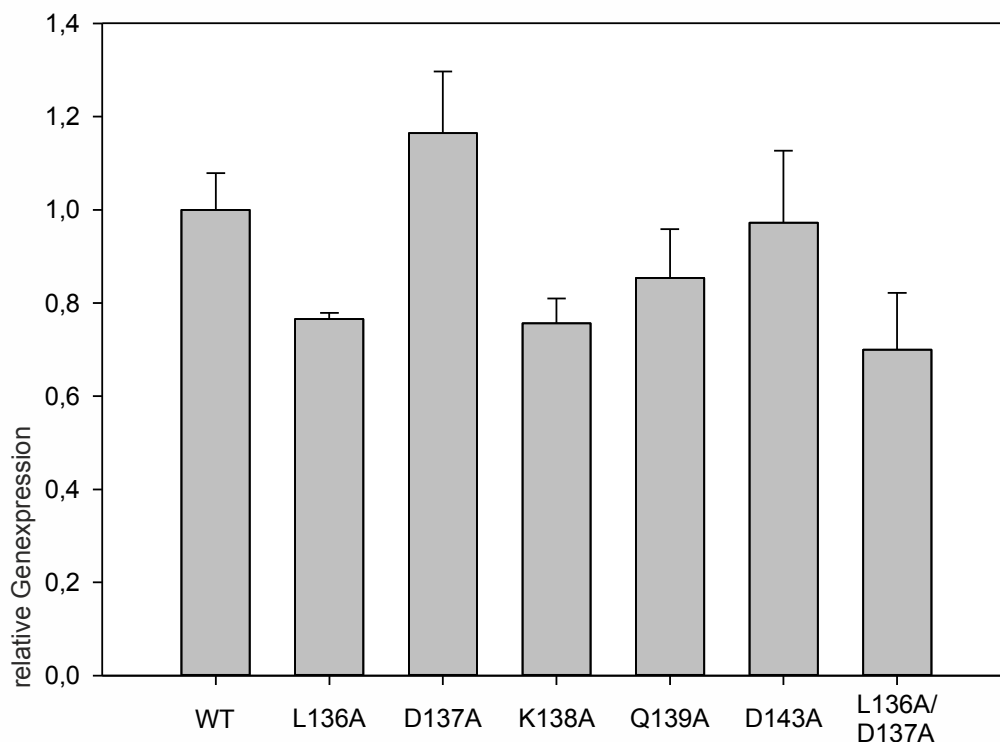


Abb. 19: Nach IFN γ -Stimulation induzieren STAT1-Wildtyp und die untersuchten Mutanten die Expression des Zielgenes *irf1*.

Mittels Realtime-PCR wurde die Menge der durch IFN γ -induzierten Gentranskripte des STAT1-Zielgenes *irf1* quantifiziert, auf die Menge des vorhandenen konstitutiv exprimierten Genes *GAPDH* normiert und zum Wildtyp in Verhältnis gesetzt. Alle untersuchten Mutanten zeigen in diesem Experiment eine mit dem Wildtyp vergleichbare Geninduktion nach IFN γ -Stimulation.

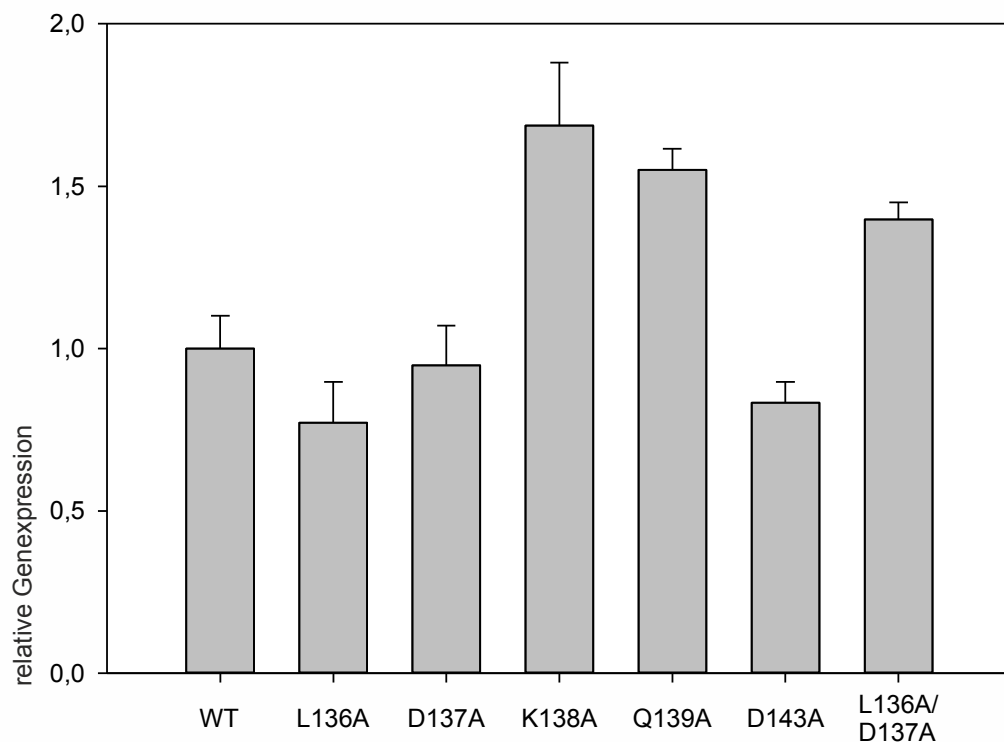


Abb. 20: Die untersuchten STAT1-Mutanten zeigen eine dem Wildtyp gleiche oder sogar gesteigerte Induktion des STAT1-Zielgenes *mig1* nach IFN γ -Stimulation.

Analog zu den in Abb. 18 und 19 gezeigten Experimenten wurde die Genexpression des STAT1-Zielgenes *mig1* quantifiziert und ausgewertet. Dabei konnte bei den Mutanten L136A, D137A und 143A eine mit dem Wildtyp vergleichbare Geninduktion beobachtet werden. Die Mutanten K138A, Q139A sowie L136A/D137A führten sogar zu einer gesteigerten Transkription von *mig1*.

6 Diskussion

Die wesentliche Funktion der Proteine der STAT-Familie besteht in der Übertragung von Signalen von außerhalb der Zelle in den Zellkern. Hier können die STAT-Proteine direkt in die Regulation der Expression entsprechender Zielgene eingreifen. Dies geschieht vorrangig über den sog. Jak-STAT-Signalweg. Der initialisierende Schritt dieses Jak-STAT-Signalweges ist die Bindung eines extrazellulären Polypeptides wie IFN α oder IFN γ an zwei unabhängige Untereinheiten eines korrespondierenden, transmembranen Rezeptors. Entsprechend dem stimulierenden Polypeptid handelt es sich etwa bei STAT1, dem wahrscheinlich am besten untersuchten Mitglied der STAT-Proteinfamilie, um den Interferon- α/β -Rezeptor (IFNAR) bzw. den Interferon- γ -Rezeptor (IFNGR). Die Zytokin-Bindung führt zunächst zu einer Konformationsänderung und Dimerisierung der beiden Rezeptor-Untereinheiten. Die Dimere können nun Rezeptor-assoziierte Janus-Kinasen (JAK) durch Transphosphorylierung aktivieren. Anschließend phosphorylieren die Kinasen einen zytoplasmatischen Tyrosinrest jeder Rezeptoruntereinheit. Der Rezeptor wird dadurch in die Lage versetzt, eine Bindestelle für STAT-Proteine bereitzustellen (Schindler und Darnell, 1995). Der Phosphotyrosinrest des Rezeptors kann nun durch die SH2-Domäne eines STAT1-Moleküls erkannt und gebunden werden. Anschließend wird das Rezeptor-gebundene STAT1-Protein von den aktivierten JAKs an einem Tyrosin an Position 701 phosphoryliert.

Nach erfolgter Phosphorylierung lösen sich die STAT1-Proteine vom Rezeptor und bilden Homo- bzw. Heterodimere. Dies geschieht durch reziproke Wechselwirkungen der SH2-Bindetasche des einen STAT1-Monomers mit dem phosphorylierten Tyrosinrest des kontralateralen Monomers (Shuai et al., 1994). Nun kommt es zu einer raschen Translokation der aktivierten STAT1-Dimere vom Zytoplasma in den Nukleus. Dieser Transport benötigt kein intaktes Zytoskelett in der Zelle und ist somit von diesem unabhängig

(Lillemeier et al., 2001). Der Import benötigt jedoch das Vorhandensein eines nukleären Lokalisationsignals. Dieses befindet sich in der DNA-Bindedomäne von STAT1 und unterscheidet sich von den klassischen nukleären Lokalisationsignalen des SV40 T-Antigens (Melén et al., 2001; Meyer et al., 2002a). Das Tyrosin-phosphorylierte STAT1-Dimer kann so durch Importin- $\alpha 5$ erkannt und durch Importin- $\alpha 5$ /Importin- $\beta 1$ -Heterodimere zum Kernporenkomplex (NPC) transportiert werden (Sekimoto et al., 1997). Der nukleozytoplasmatische Transport dieser Komplexe erfolgt unter Bereitstellung von Energie durch die Hydrolyse von GTP, welche mittels Katalyse durch Ran-Proteine genannte GTPasen geschieht (Sekimoto et al., 1996; Kaffman und O'Shea, 1999). STAT-Dimere, die nun im Kern akkumulieren, können jetzt an spezifische Promotorregionen auf der nukleären DNA binden. Homodimere aus STAT1, die vor allem nach Stimulation durch Interferon- γ gebildet werden, binden dabei an charakteristische Sequenzen, die als GAS-Sequenzen (Gamma Activating Sequence) bezeichnet werden. Diese GAS-Bindestellen bestehen aus der Sequenz TTCN₍₂₋₄₎GAA (wobei N für ein beliebiges Nukleotid steht) und sind spezifisch für die Bindung von homodimeren STAT1-Komplexen (Decker et al., 1997; Stark et al., 1998).

Durch Stimulation mit Interferon- α/β werden sowohl STAT1- als auch STAT2-Proteine phosphoryliert. Es bilden sich dadurch STAT1/STAT2-Heterodimere aus. Diese Heterodimere bilden zusammen mit dem zytosolischen Interferon-regulatorischen Faktor 9 (IRF-9) einen Komplex. Das als Interferon-Stimulating-Gene-Factor-3 (ISGF-3) bezeichnete Trimer wird anschließend in den Nukleus transportiert (Bluyssen et al., 1996). Der ISGF-3 kann dann an Promotoren binden, die das so genannte Interferon-stimulated-Response-Element (ISRE) enthalten. Das ISRE hat die Basensequenz AGTTT-CNNTTCC (wobei für N ein beliebiges Nukleotid eingesetzt werden kann) (Li et al., 1998; Wesoly et al., 2007). Die Bindung von STAT-Dimeren an spezifischen Promotorregionen führt zu einer Steigerung der Transkription der entsprechenden Zielgene. Darüber hinaus ist auch eine kooperative Bindung von nah beieinanderliegenden Promotorregionen durch mehrere STAT-Dimere möglich. Durch sie kommt es zu einer stärkeren Aktivierung der Tran-

skription (Xu et al., 1996; Darnell, 1997). Nach Dissoziation der STAT-Dimere von DNA kommt es auf zwei Wegen zur Deaktivierung von STAT. Der eine Weg soll zu einem Ubiquitin-vermittelten Abbau der aktivierten STAT-Dimere im Proteasom führen (Haspel et al., 1996; Kim und Maniatis, 1996). Wichtig ist in diesem Zusammenhang die Dephosphorylierung der aktivierten STAT-Dimere durch die Phosphatase TC45, eine nukleäre Isoform der T-Zell Tyrosin-Phosphatase (ten Hoeve et al., 2002). Da das phosphorylierte Tyrosin in der parallelen Dimer-Form von STAT1 einer Dephosphorylierung durch TC45 nicht zugänglich ist, erfordert die enzymatische Inaktivierung eine Reorientierung des Dimers in seine antiparallele Form. Die dephosphorylierten Dimere sind nicht länger an Zytokin-responsiven Genen transkriptionell aktiv (Haspel und Darnell, 1999).

Die dephosphorylierten STAT-Proteine werden nun aus dem Nukleus zurück in das Zytoplasma transportiert. Dies geschieht durch einen aktiven Transport mittels des Exportins Chromosome Region Maintenance-1 (CRM1). Es erkennt ein nukleäres Export-Signal (NES) von STAT-Proteinen und transportiert diese durch den Kernporenkomplex. Die Energie für diesen Transport wird auch hier von der GTPase Ran zur Verfügung gestellt. Wird CRM1 durch Leptomycin B (LMB) inhibiert, kommt dieser nukleäre Exportmechanismus von STAT1 zum Erliegen (Lödige et al., 2005; Reich, 2007). In der Literatur wurden nukleäre Exportsignale in der Coiled-coil-Domäne (Begitt et al., 2000) sowie in der DNA-Bindedomäne (McBride et al., 2000) von STAT1 beschrieben. Neben diesem Mechanismus wird mindestens noch ein weiteres Exportverfahren vermutet, da eine Blockierung des Mechanismus durch LMB den Kernexport nicht vollständig hemmt. Diese zusätzliche Exportvariante ist bislang allerdings nicht vollständig aufgeklärt worden (Begitt et al., 2000). Nach erfolgtem nukleärem Export sind die unphosphorylierten STAT-Monomere erneut für Phosphorylierung und Dimerisierung zugänglich. Abb. 19 zeigt eine schematische Zusammenfassung des Jak-STAT-Signalweges.

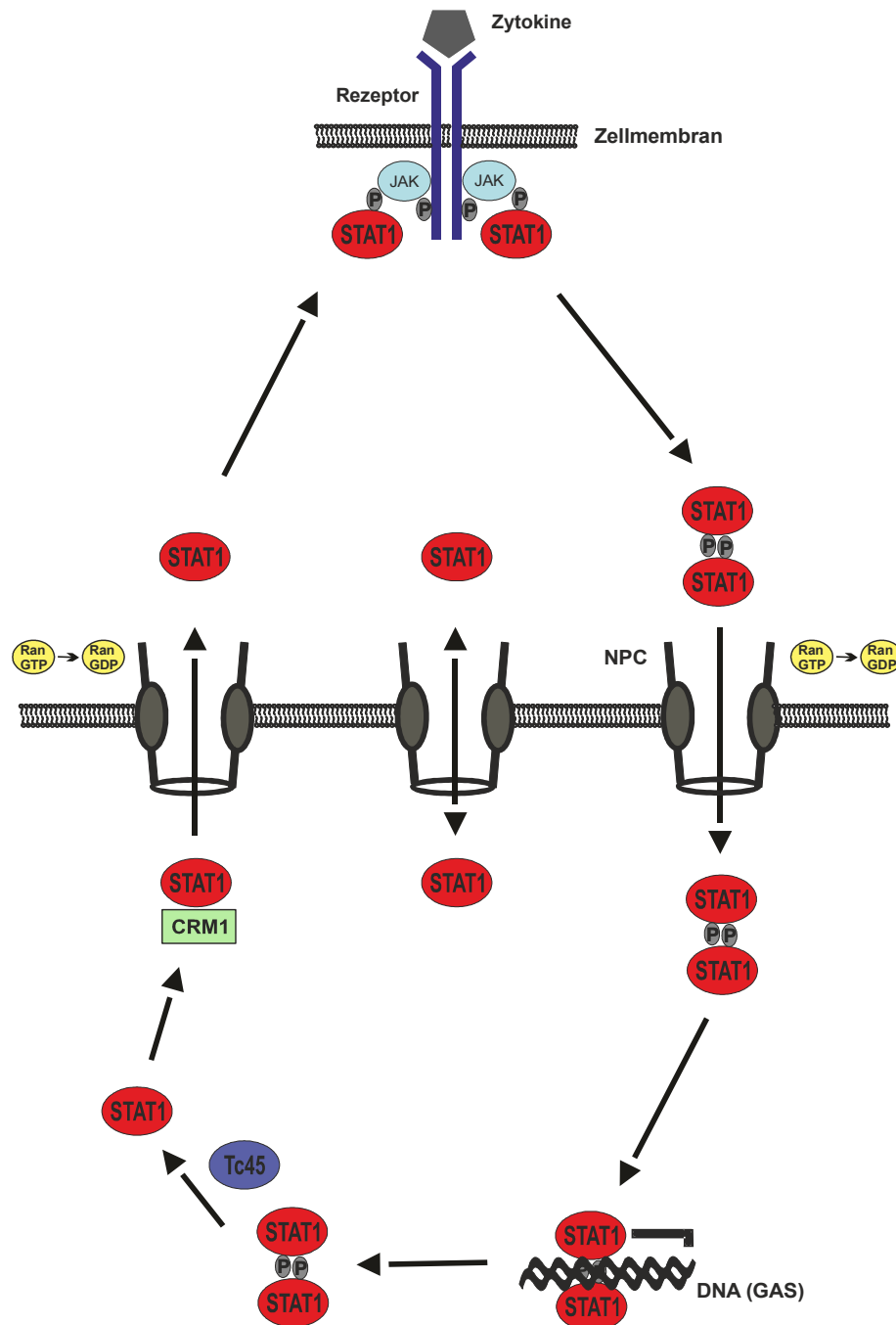


Abb. 21: Zytokin-vermittelter Kernimport und -export von STAT1

Die Abbildung stellt den Zyklus der STAT1-Translokation nach Stimulation mit Zytokinen dar. Nach Aktivierung des Rezeptors durch Zytokine kommt es zur Phosphorylierung und Dimerisierung von STAT1. Die Dimere werden RanGTP-abhängig in den Kern transportiert und binden dort an die DNA. Anschließend werden sie durch TC45 dephosphoryliert, bevor sie anhand eines CRM1-abhängigen, RanGTP-verbrauchenden Mechanismus aus dem Kern transportiert werden. Nun stehen sie für einen erneuten Zyklus zur Verfügung. Daneben existiert ein konstitutiver Transport von unphosphoryliertem STAT1 zwischen Zytoplasma und Kernkompartiment.

Neben diesem Zytokin-abhängigen Kernimport und -export werden unphosphorylierte STAT-Monomere auch ohne Stimulation in den Zellkern und wieder hinaus transportiert. Auf diese Weise wird eine gleichbleibende Verteilung der STAT-Proteine in der unstimulierten Zelle sichergestellt (Meyer et al., 2002b). Der nukleäre Import erfolgt in diesem Fall nicht mit Hilfe des Importin-Systems. Vielmehr werden STAT-Monomere in einem Energie-unabhängigen Prozess durch direkte Bindung an Nucleoporine 153 und 214 in den Kern befördert (Marg et al., 2004).

Der Jak-STAT-Signalweg wird durch Interaktionen mit verschiedenen weiteren Proteinen auf unterschiedliche Weise moduliert: Proteine der Familie der „Suppressors of Cytokine Signaling“ (SOCS) gehören zu den wichtigsten negativ regulierenden Faktoren der Genaktivierung durch STAT-Proteine. Sie sind in der Lage, mit Hilfe einer SH2-Domäne die aktivierten Zytokin-Rezeptoren zu erkennen und blockieren die Aktivierung von STAT-Proteinen, indem sie deren Phosphorylierung durch Janus-Kinasen hemmen. SOCS-Proteine stellen eine direkte negative Rückkopplung für den Jak-STAT-Signalweg dar, da sie selbst von STAT-Zielgenen kodiert und dadurch vor allem nach STAT-Aktivierung von der Zelle transkribiert werden (Kile und Alexander, 2001). Eine weitere Gruppe von negativ rückkoppelnden Proteinen bilden die Mitglieder der PIAS-Familie (Protein Inhibitors of Activated STAT). Sie sind ausschließlich im Zellkern lokalisiert und binden an phosphorylierte STAT-Dimere. Auf diese Weise hemmen sie die Bindung der Dimere an Promotorregionen ihrer Zielgene (Liu et al., 1998; Shuai, 2000).

Mutationen in STAT1-Proteinen können deren Eigenschaft als Transkriptionsfaktoren verändern und so wichtige Funktionen des Immunsystems beeinträchtigen. Dies kann zum einen durch Abnahme oder Verlust der Fähigkeit der Bindung von DNA durch STAT1 bei so genannten Loss-of-function-Mutanten bedingt sein. In diesem Fall wird die Aktivierung von STAT1-Zielgenen durch den Jak-STAT-Signalweg abgeschwächt oder fällt komplett aus. Zum anderen kann eine Immunschwäche auch durch eine Zunahme der DNA-Bindeaffinität und damit einhergehender, übermäßig star-

ker Expression von STAT1-Zielgenen bedingt sein. Diese Veränderungen werden entsprechend Gain-of-function-Mutationen genannt (Liu et al., 2011).

Bislang konnten mehrere Loss-of-function-Mutationen bei Patienten identifiziert werden. Die dominant vererbten Mutanten E320Q, Q463H, K637E, K673R und L706S liegen in der src-Homology-2-Domäne sowie in der DNA-Bindedomäne des Proteins. Patienten mit diesen Mutationen leiden vor allem unter einer vererbten Anfälligkeit für Infektionen, hervorgerufen durch wenig pathogene Mykobakterien, die bei immunkompetenten Personen zu keiner Infektion führen. Darüber hinaus sind die rezessiv vererbten Mutanten A46T, K201N, K211R, L600P und P696S beschrieben. Sie sind assoziiert mit einer Häufung von systemischen Infektionen durch intrazelluläre Bakterien, wie *Salmonella* und *Shigella*, sowie durch Viren.

Die Anfälligkeit für virale Infekte bei Funktionsverlust des STAT1 wurde besonders deutlich durch die Beobachtung, dass das erfolgreich als Mittel der Wahl bei viralen Hepatitiden eingesetzte Ribavirin die Bindung von STAT1 an Interferon-stimulated Response Elements (ISRE) verstärkt und damit die Proteinexpression der STAT1-Zielgene erhöht (Zhang et al., 2003). Zu den viralen Erkrankungen zählen Infektionen mit dem Zytomegalievirus (ZMV), Epstein-Barr-Virus (EBV) und Herpes simplex (Vairo et al., 2011). Averbuch et al. (2011) konnten zeigen, dass auch eine Vulnerabilität insbesondere gegenüber Infektionen mit dem Respiratorial Syncitial Virus (RSV) wahrscheinlich ist.

Diesen Loss-of-function-Mutanten stehen die Gain-of-function-Mutanten gegenüber. Die bislang identifizierten Mutanten D165H, Y170N, C174R, M202I, A267V, Q271P, R274W, K286I und T288A sind in der Coiled-coil-Domäne lokalisiert. Patienten mit diesen Mutationen leiden unter chronischen mukokutanen Infektionen mit *Candida albicans* (Liu et al., 2011). Liu et al. konnten zeigen, dass sich diese Mutanten einer nukleären Dephosphorylierung entziehen und, einmal aktiviert, im Kern akkumulieren und eine übermäßige Aktivierung der Zielgene bewirken. Dies führte bei den untersuchten Patienten zu einer deutlichen Reduzierung der IL-17A- und IL-22-bildenden

T-Lymphozyten, was letztlich die erhöhte Suszeptabilität gegen *Candida albicans* erklärt.

Die Coiled-coil-Domäne, die eine wichtige Rolle für die Dephosphorylierung und damit für die Beendigung der Signaltransduktion durch STAT1 übernimmt, sollte in der vorliegenden Arbeit weiter untersucht werden. Dazu wurde mittels Mutagenese einzelner Aminosäuren in der Coiled-coil-Domäne nach weiteren funktionell bedeutsamen Mutationen gesucht. Die eingeführten Mutationen wurden zunächst durch Sequenzierung der DNA überprüft und anschließend mittels Transfektion in humanen Zelllinien exprimiert. Die Funktion der mutierten Proteine konnte auf diese Weise mit verschiedenen biochemischen Methoden getestet werden.

Zunächst wurde die intrazelluläre Verteilung der STAT1-Proteine durch fluoreszenzmikroskopische Analysen bestimmt. Dazu wurden Zellen, die GFP-markierte STAT1-Mutanten exprimieren, zunächst mit Interferon stimuliert und anschließend mit dem Kinaseinhibitor Staurosporin inkubiert. Bei regelrechter Proteinfunktion ist dabei eine Kernakkumulation von STAT nach Stimulation durch Interferon sowie ein anschließender Zusammenbruch der Kernakkumulation nach Beendigung der Phosphorylierung durch die Zugabe von Staurosporin zu erwarten. Eine ausbleibende Kernakkumulation könnte hier auf eine mangelnde Phosphorylierung der STAT1-Proteine nach Rezeptoraktivierung hinweisen oder in einem gestörten Kerntransport der phosphorylierten STAT-Dimere begründet sein. Eine persistierende Kernakkumulation nach Inkubation der Zellen mit Staurosporin spricht dagegen für einen defekten Kernexport der Mutanten. Dies kann entweder durch eine fehlende Dephosphorylierung der aktivierten STAT-Dimere oder durch einen gestörten Kernexport der dephosphorylierten STAT-Monomere bedingt sein.

Im vorliegenden Fall glichen alle getesteten Mutanten in ihrer intrazellulären Verteilung dem Wildtyp. Eine Störung des Kernimportes bzw. des -exportes ist daher unwahrscheinlich. Zur Überprüfung dieser Analysen wurden zusätzlich STAT1-Mutanten ohne GFP-Addukt in STAT1-defiziente humane Zelllinien eingebracht und die Zellverteilung nach Interferon- und Staurosporin-

Inkubation mittels einer immunzytochemischen Markierung der Proteine überprüft. Auch hier zeigte sich eine normgerechte intrazelluläre STAT1-Verteilung bei allen getesteten Mutanten. Ein störender Einfluss durch GFP-Markierung der mutierten Proteine konnte so ausgeschlossen werden.

In einer weiteren Reihe von Experimenten wurde die Kinetik der Phosphorylierung bzw. der Dephosphorylierung der STAT1-Mutanten genauer untersucht und mit der des Wildtyps verglichen. Dazu wurden erneut humane Zellen mit Plasmiden, die mutierte STAT1-Proteine exprimieren, transfiziert, diese am Folgetag mit Interferon stimuliert und im Anschluss daran mit Staurosporin inkubiert. Zu verschiedenen Zeitpunkten der Inkubation wurden nun Zellextrakte hergestellt, diese mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf Membranen übertragen. Mittels Antikörper gegen phosphoryliertes STAT1 sowie gegen jegliches STAT1 konnte nun der Anteil an phosphoryliertem Protein abgeschätzt werden. Hier ergaben sich keine Unterschiede im Vergleich der Mutanten mit dem Wildtyp, sodass sich aus diesen Experimenten kein Anhalt für einen Phosphorylierungs- bzw. Dephosphorylierungsdefekt ergab.

Um die Fähigkeit der DNA-Bindung bzw. die DNA-Bindeaffinität der STAT1-Mutanten zu untersuchen, wurden EMSA-Experimente durchgeführt. Dazu wurden Zellextrakte mit radioaktiv markierten DNA-Sonden inkubiert und die entstandenen STAT1-DNA-Komplexe durch Elektrophorese aufgetrennt. Als DNA-Sonden wurden Oligonukleotide mit einer GAS-Bindestelle (M67), mit einer GAS-Bindestelle neben einer degenerierten GAS-Bindestelle (GAS-nonGAS) sowie mit zwei benachbarten, degenerierten GAS-Bindestellen (2xnonGAS) eingesetzt. Mittels Supershift wurde dabei sichergestellt, dass es sich bei den abgebildeten Protein-DNA-Komplexen tatsächlich um Komplexe aus STAT1 und DNA handelt. Bei regelrechter DNA-Bindung sollten STAT1-DNA-Komplexe bei Inkubation mit den Sonden M67 und GAS-nonGAS entstehen und auf dem Gelshift als Bande sichtbar werden. Eine defekte DNA-Bindung würde sich dagegen in einer Abschwächung oder einem Fehlen der entsprechenden Banden äußern. Sollte eine veränderte Zielgenerkennung die Bindung der STAT-Proteine auch an der degenerierten

GAS-Bindestelle ermöglichen, so sind zusätzliche Banden zu erwarten. Die untersuchten Mutanten glichen jedoch in den durchgeführten Experimenten dem Bandenmuster des Wildtypes, sodass eine Auswirkung der eingeführten Mutationen auf die korrekte Erkennung von DNA-Mustern der STA1-Proteine unwahrscheinlich ist.

Neben der intakten Erkennung von DNA-Sonden durch die Mutanten wurde auch die Stabilität der DNA-Bindung überprüft. Dazu wurden in weiteren EMSA-Analysen Zellextrakte zunächst mit der radioaktiv markierten DNA-Sonde 2xGAS mit zwei benachbarten GAS-Bindestellen inkubiert und anschließend eine Kompetition mit unmarkierter M67-Sonde durchgeführt. Auf diese Weise konnte zum einen die Stabilität der Bindung der mutierten STAT1-Proteine an DNA, zum anderen die Fähigkeit der Mutanten zur kooperativen DNA-Bindung durch Bildung von STAT-Tetrameren überprüft werden. Ohne Kompetition zeigte der Gelshift jeweils eine Bande für tetramere und für dimere STAT1-DNA-Komplexe. Unter Kompetition durch M67-DNA, die im Überschuss zugegeben wurde, wird die 2xGAS-Sonde aus der dimeren STAT1-DNA-Bindung verdrängt, die entsprechende Bande ist im Gelshift nicht mehr nachweisbar. Der stabilere, tetramere STAT1-DNA-Komplex bleibt dagegen erhalten, sodass nur noch diese Bande auf dem Gelshift erscheint. Wäre die DNA-Bindung der STAT1-Dimere durch die vorliegenden Mutationen deutlich stärker als beim Wildtyp, ließe sich nur eine abgeschwächte Verdrängung der radioaktiv markierten Sonde feststellen. Läge bei den untersuchten Mutanten dagegen eine Unfähigkeit zur Tetramerisierung und damit eine fehlende Möglichkeit zur stabileren, kooperativeren DNA-Bindung vor, so wäre im Vergleich zum Wildtyp ein fehlender Nachweis der tetrameren STAT1-DNA-Komplexe im Gelshift zu beobachten. Die untersuchten Mutanten zeigten hier ein unauffälliges Verhalten, das dem des Wildtypes gleicht. Ein Tetramerisierungsdefekt oder eine veränderte DNA-Bindeaffinität konnte dadurch mit hoher Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden.

Um die Fähigkeit der Beeinflussung der Genexpression durch die mutierten Proteine direkt zu testen, wurden zusätzlich Reportergenanalysen durchge-

führt. Dazu wurden neben den STAT1-Proteinen Reporter-genkonstrukte, die als STAT1-Zielgene fungieren, in humane Zellen eingebracht. Verwendet wurden hier Reportergene mit dem künstlichen Promotor Ly6E sowie mit Fragmenten des nativen ICAM1-Promotors (pIC-339 und pIC-1352). Nach Stimulation der Zellen mit Interferon- γ wurden Zellextrakte erstellt und in diesen die Reporter-genexpression durch Luciferasemessungen bestimmt. Eine übermäßig starke Genaktivierung durch die STAT-Mutanten würde sich entsprechend in einer höheren Konzentration der gebildeten Luciferase äußern, eine abgeschwächte oder gänzlich defekte Genaktivierung zu einer verringerten oder fehlenden Menge an Luciferase führen. Die hier getesteten Mutanten zeigten jedoch keine vom Wildtyp abweichende Aktivität der Reportergene und scheinen deshalb in ihrer Gen-induzierenden Funktion nicht gestört zu sein.

Um diese Beobachtung zu bestätigen, wurden Real-Time-PCR-Analysen durchgeführt. Auf diese Weise konnte unmittelbar die Expression der nativen STAT1-Zielgene *irf1*, *mig1* und *gbp1* nach Interferonstimulation getestet werden und so die natürliche Funktion der untersuchten Mutanten im Vergleich mit dem Wildtyp überprüft werden. Dabei zeigten sich für einige der Mutanten geringfügige Unterschiede in deren transkriptionellen Verhalten gegenüber einigen der hier untersuchten STAT1-regulierten Zielgene.

Zusammenfassend konnten mit den in dieser Arbeit durchgeführten Experimente keine signifikanten Unterschiede zwischen Wildtyp und den untersuchten STAT1-Mutanten gezeigt werden. Aus diesem Grund kann mit großer Wahrscheinlichkeit davon ausgegangen werden, dass die mutierten Aminosäurereste die funktionale Integrität des Proteines nicht beeinflussen.

Die Rolle der aminoterminalen Übergangsregion wurde auch von anderen Autoren untersucht. Mertens und Mitarbeiter gelang es kürzlich zu zeigen, dass die auch als Schanier bezeichnete Übergangsregion entscheidend für die Dephosphorylierung von aktivierten STAT1-DNA-Komplexen und damit für die Beendigung der signalvermittelten Proteinexpression ist. Die Autoren führten ebenfalls Mutationen im Bereich der Aminosäurenpositionen 120 bis

142 durch und überprüfen die Auswirkungen auf die Funktion des Proteins. Hierbei stellte sich heraus, dass auch der ausgedehnte Austausch von Aminosäuren nicht zu einer Veränderung der Fähigkeit zur Phosphorylierung oder Dephosphorylierung führt, wohl aber eine Kürzung der Region durch Deletion mehrerer Aminosäuren. So wurde das Entfernen von bis zu sieben Aminosäuren ohne Funktionsausfall toleriert, ein Entfernen von 12 Aminosäuren führte dagegen zu einem Dephosphorylierungsdefekt der Mutante.

STAT1-Dimere können sowohl als parallele Homodimere, als auch als antiparallele Homodimere vorliegen (Mao et al., 2005). Die parallele Form wird durch Wechselwirkungen des phosphorylierten Tyrosin-701 eines Monomers mit der Src-Homology-2-Domäne des anderen Monomers stabilisiert. Die antiparallele Form wird dagegen durch Verbindung der Coiled-coil-Domäne des einen Monomers mit der DNA-Bindedomäne des anderen Monomers sowie durch Interaktion der beiden aminoterminalen Domänen gebildet. Mertens und Kollegen fanden heraus, dass dieses beschriebene Übergangsfragment eine essentielle Funktion als flexible Verbindung von aminoterminaler Domäne und Coiled-coil-Domäne inne hat. Diese flexible Verbindung scheint notwendig zu sein, um eine Konformationsänderung der phosphorylierten STAT1-Dimere von der parallelen zur antiparallelen Form zu ermöglichen. Ist diese flexible Domäne zu kurz, kann eine Umlagerung nicht stattfinden. Da in der parallelen Form das phosphorylierte Tyrosin-701 für die TC45-Phosphatase nicht zugänglich ist, ist eine Umlagerung des Proteins jedoch Voraussetzung für die Dephosphorylierung der STAT1-Dimere. Fehlt durch ein zu kurzes Übergangsfragment die Fähigkeit zur Umlagerung in die antiparallele Form, bleiben einmal aktivierte STAT1-Dimere phosphoryliert, akkumulieren im Zellkern und stehen weiter als aktivierte Transkriptionsfaktoren zur Verfügung. Die in dieser Arbeit eingeführten Mutanten unterscheiden sich nur durch den Austausch von einer bis zwei Aminosäuren vom Wildtyp. Die Länge der Sequenz ist unverändert. Analog zu den zitierten Untersuchungsergebnissen von Mertens und Kollegen konnte auch bei diesen Mutanten kein Dephosphorylierungsdefekt festgestellt werden.

Zusammen zeigen die gefundenen Ergebnisse, dass die exakte Abfolge von Aminosäuren in dem Übergangsfragment nicht von essentieller Bedeutung zu sein scheint. Wohl aber ist ihre Eigenschaft als ausreichend lange, flexible Verbindung der aminoterminalen Domäne mit der Coiled-coil-Domäne von großer Wichtigkeit für die Erzielung einer effektiven transkriptionellen Antwort.

7 Literaturverzeichnis

Averbuch, D., Chappier, A., Boisson-Dupuis, S., Casanova, J.L., Engelhard, D. (2011) The clinical spectrum of patients with deficiency of Signal Transducer and Activator of Transcription-1. *Pediatr Infect Dis J* **30**, 352-5.

Bach, E.A., Aguet, M., Schreiber, R.D. (1997) The IFN gamma receptor: a paradigm for cytokine receptor signaling. *Annu Rev Immunol* **15**, 563-91.

Balkwill, F.R., Burke, F. (1989) The cytokine network. *Immunol Today* **10(9)**, 299-304.

Barahmand-Pour, F., Meinke, A., Groner, B., Decker, T. (1998) Jak2-Stat5 interactions analyzed in yeast. *J Biol Chem* **273**, 12567–12575.

Begitt, A., Meyer, T., van Rossum, M., Vinkemeier, U. (2000) Nucleocytoplasmic translocation of Stat1 is regulated by a leucine-rich export signal in the coiled-coil domain. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**, 10418-10423.

Bluyssen, A.R., Durbin, J.E., Levy, D.E. (1996) ISGF3 gamma p48, a specificity switch for interferon activated transcription factors. *Cytokine Growth Factor Rev* **7** 11-7.

Bowman, T., Garcia, R., Turkson, J., Jove, R. (2000). STATs in oncogenesis.. *Oncogene* **19**, 2474-2488.

Brierley, M.M., Fish, E.N. (2005) Stats: multifaceted regulators of transcription. *J Interferon Cytokine Res* **25**, 733-44.

Chatterjee-Kishore, M., Wright, K. L., Ting, J. P., Stark, G. R. (2000) How Stat1 mediates constitutive gene expression: a complex of unphosphorylated Stat1 and IRF1 supports transcription of the LMP2 gene. *EMBO J.* **19**, 4111-4122.

Chen, X., Vinkemeier, U., Zhao, Y., Jeruzalmi, D., Darnell, J., Kuriyan, J. (1998) Crystal Structure of a Tyrosine Phosphorylated STAT-1 Dimer Bound to DNA. *Cell* **93**, 827-839.

Clemens, M.J., Elia, A. (1997) The double-stranded RNA-dependent protein kinase PKR: structure and function. *J Interferon Cytokine Res.* **17**, 503-24.

Coze, C.M. (1994) Glossary of cytokines. *Baillieres Clin Haematol.* **7**, 1-15.

Darnell, J.E.J., Kerr, I.M., Stark, G.R. (1994) Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science* **264**, 1415-1421.

Darnell, J.E.J. (1997) STATs and gene regulation. *Science* **277**, 1630-1635.

Decker, T., Kovarik, P., Meinke, A. (1997) GAS elements: a few nucleotides with a major impact on cytokine-induced gene expression. *J. Interferon Cytokine Res.*, **17**, 121-134.

Decker, T., Kovarik, P. (2000) Serine phosphorylation of STATs. *Oncogene* **19**, 2628-2637.

Eckerskorn, C., Mewes, W., Goretzki, H., Lottspeich, F. (1988) A new siliconized-glass fiber as support for protein-chemical analysis of electroblotted proteins. *Eur J Biochem* **176**, 509-519.

Greenlund, A.C., Morales, M.O., Viviano, B.L., Yan, H., Krolewski, J., Schreiber, R.D. (1995) Stat recruitment by tyrosine-phosphorylated cytokine receptors: an ordered reversible affinity-driven process. *Immunity* **2**, 677-687.

Gupta, S., Yan, H., Wong, L. H., Ralph, S., Krolewski, J., Schindler, C. (1996) The SH2 domains of Stat1 and Stat2 mediate multiple interactions in the transduction of IFN- α signals. *EMBO J* **15**, 1075-1084.

Haspel, R.L., Darnell, J.E., Jr. (1999) A nuclear protein tyrosine phosphatase is required for the inactivation of Stat1. *Proc Natl Acad Sci USA*, **96**, 10188-10193.

Haspel, R.L., Salditt-Georgieff, M., Darnell, J.E., Jr. (1996) The rapid inactivation of nuclear tyrosine phosphorylated Stat1 depends upon a protein tyrosine phosphatase. *EMBO J.*, **15**, 6262-6268.

ten Hoeve, J., de Jesus Ibarra-Sanchez, M., Fu, Y., Zhu, W., Tremblay, M., David, M., Shuai, K. (2002) Identification of a nuclear Stat1 protein tyrosine phosphatase. *Mol Cell Biol* **22**, 5662-5668.

Horvath, C.M., Stark, G.R., Kerr, I.M., Darnell, J.E. Jr. (1996) Interactions between STAT and non-STAT proteins in the interferon-stimulated gene factor 3 transcription complex. *Mol Cell Biol*. **16**, 6957-64.

Kaffmann, A., O`Shea, E.K. (1999) Regulation of nuclear localization: a key to a door. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, **15**, 291-339.

Kaplan D. H., Shankaran V., Dighe A. S., Stockert E., Aguet M., Old L.J., Schreiber R. D. (1998) Demonstration of an interferon gamma-dependent tumor surveillance system in immunocompetent mice. *Proc Natl Acad Sci USA*. **95**, 7556-61.

Kile, B.T., Alexander, W.S. (2001) The suppressors of cytokine signalling (SOCS). *Cell Mol Life Sci.* **58**, 1627-35.

Kim, T.K., Maniatis, T. (1996) Regulation of interferon- γ -activated STAT1 by the ubiquitin-proteasome pathway. *Science*, **273**, 1717-1719.

Kisseleva, T., Bhattacharya, S., Braunstein, J., Schindler, C. W. (2002) Signaling through the JAK/STAT pathway, recent advances and future challenges. *Gene* **285**, 1-24.

Kovarik, P., Mangold, M., Ramsauer, K., Heidari, H., Steinborn, R., Zotter, A., Levy, D.E., Müller, M., Decker, T. (2001) Specificity of signaling by STAT1 depends on SH2 and C-terminal domains that regulate Ser727 phosphorylation, differentially affecting specific target gene expression. *EMBO J.* **15**, 91-100.

Kunisada, K., Negoro, S., Tone, E., Funamoto, M., Osugi, T., Yamada, S., Okabe, M., Kishimoto, T., Yamauchi-Takahara, K. (2000) Signal transducer and activator of transcription 3 in the heart transduces not only a hypertrophic signal but a protective signal against doxorubicin-induced cardiomyopathy. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**, 315-319.

Ikeda H., Old L. J., Schreiber R. D. (2002) The roles of IFN gamma in protection against tumor development and cancer immunoediting. *Cytokine Growth Factor Rev.* **13** 95-109.

Isaacs, A., Lindenmann, J. (1957) Virus interference. I. The interferon. *Proc R. Soc Lond B* **147**, 258-267.

Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.

Lee, C.K., Rao, D.T., Gertner, R., Gimeno, R., Frey, A.B., Levy, D.E. (2000) Distinct requirements for IFNs and STAT1 in NK cell function. *J Immunol* **165**, 3571-3577.

Li, X., Leung, S., Burns, C., Stark, G.R. (1998) Cooperative binding of Stat1-2 heterodimers and ISGF3 tandem DNA elements. *Biochemie* **80**, 703-710.

Lillemeier, B.F., Köster, M., Kerr, I.M. (2001) STAT1 from the cell membrane to the DNA. *EMBO* **20(10)**, 2508-17.

Liu, B., Liao, J., Rao, X., Kushner, S.A., Chung, C.D., Chang, D.D., Shuai, K. (1998) Inhibition of Stat1-mediated gene activation by PIAS1. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**, 10626-10631.

Liu, L., Okada, S., Kong, X.F. et al. (2011) Gain-of-function human STAT1 mutations impair IL-17 immunity and underlie chronic mucocutaneous candidiasis. *J Exp Med*. **208**, 1635-48.

Lödige, I., Marg, A., Wiesner, B., Malecová, B., Oelgeschläger, T., Vinkemeier, U. (2005) Nuclear export determines the cytokine sensitivity of STAT transcription factors. *J Biol Chem*. **280**, 43087-99.

Loppnow, H. (2001) Cytokines: classification, receptors, mechanisms of action, *Der Internist* **42**, 17-27.

Mao, X., Ren, Z., Parker, G.N., Sondermann, H., Pastorello, M.A., Wang, W., McMurray, J.S., Demeler, B., Darnell, J.E. Jr., Chen, X. (2005) Structural bases of unphosphorylated STAT1 association and receptor binding. *Mol Cell* **17**, 761-71.

Marg, A., Shan, Y., Meyer, T., Meissner, T., Brandenburg, M., Vinkemeier, U. (2004) Nucleocytoplasmic shuttling by nucleoporins Nup153 and Nup214 and CRM1-dependent nuclear export control the subcellular distribution of latent Stat1. *J Cell Biol* **165**, 823-833.

McBride, K.M., McDonalds, C. und Reich, N.C. (2000) Nuclear export signal located within the DNA-binding domain of the STAT1 transcription factor. *EMBO J.* **19**, 6196-6206.

Melén K., Kinnunen, L., Julkunen, I. (2001) Arginine/Lysine-rich structural element is involved in Interferon-induced nuclear import of STATs. *J Biol Chem* **276**, 16447-6455.

Mertens, C., Zhong, M., Krishnaraj, R., Zou, W., Chen, X., Darnell, J.E. Jr. (2006) Dephosphorylation of phosphotyrosine on STAT1 dimers requires extensive spatial reorientation of the monomers facilitated by the N-terminal domain. *Genes Dev* **20**, 3372-3381.

Meyer, T., Begitt, A., Lödige, I., van Rossum, M., Vinkemeier, U. (2002a) Constitutive and IFN-gamma-induced nuclear import of STAT1 proceed through independent pathways. *EMBO J* **21**, 344-354.

Meyer,T., Gavenis,K. and Vinkemeier,U. (2002b) Cell type-specific and tyrosine phosphorylation-independent nuclear presence of STAT1 and STAT3. *Exp. Cell Res.* **272**, 45-55.

Meyer, T., Hendry, L., Begitt, A., John, S. and Vinkemeier, U. (2004) A single residue modulate tyrosine dephosphorylation, oligomerization, and nuclear accumulation of stat transcription factors. *J. Biol. Chem.* **279**, 18998-19007.

Miller C. H., Maher S. G., Young H. A. (2009) Clinical Use of Interferon-gamma. *Ann N Y Acad Sci.* **1182**, 69-79.

Oritani K., Kincade P. W., Zhang C., Tomiyama Y., Matsuzawa Y. (2001) Type I interferons and limitin: a comparison of structures, receptors, and functions. *Cytokine Growth Factor Rev.* **12**, 337-48.

Pestka S., Krause C. D., Walter M. R. (2004) Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors. *Immunol Rev.* **202**, 8-32.

Pfaffl, M.W. (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* **29**, e45.

Rebouillat, D., Hovanessian, A.G. (1999) The human 2',5'-oligoadenylate synthetase family: interferon-induced proteins with unique enzymatic properties. *J Interferon Cytokine Res.* **19**, 295-308.

Reich, N.C. (2007) STAT dynamics. *Cytokine & Growth Factor Rev.* **18**, 511–518.

Samuel C. E. (2001) Antiviral actions of interferons. *Clin Microbiol Rev.* **14**, 778-809.

Schindler, C. und Darnell, J.E., Jr. (1995). Transcriptional responses to polypeptide ligands: the JAK-STAT pathway. *Annu Rev Biochem* **64**, 621-651.

Schroder K., Hertzog P. J., Ravasi T., Hume D. A. (2004) Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *J Leukoc Biol.* **75**, 163-89.

Sekimoto, T., Nakajima, K., Tachibana, T., Hirano, T., Yoneda, Y. (1996) Interferon-gamma-dependent nuclear import of Stat1 is mediated by the GTPase activity of Ran/TC4. *J Biol Chem* **271**, 31017-31020.

Sekimoto, T., Imamoto, N., Nakajima, K., Hirano, T., Yoneda, Y. (1997) Extra-cellular signal-dependent nuclear import of Stat1 is mediated by nuclear pore-targeting complex formation with NPI-1, but not Rch1. *EMBO J* **16**, 7067-7077.

Shen, Y., Darnell, J.E.Jr. (2001) Antiviral response in cells containing Stat1 with heterologous transactivation domains. *J Virol.* **75**, 2627-33.

Shuai, K., Stark, G.R., Kerr, I.M., Darnell, J.E. Jr. (1993) A single phosphotyrosine residue of Stat91 required for gene activation by interferon- γ . *Science*, **261**, 1744-1746.

Shuai, K., Horvath, C. M., Huang, L. H., Qureshi, S.A., Cowburn, D., Darnell, J.E. Jr. (1994) Interferon activation of the transcription factor Stat91 involves dimerization through SH2-phosphotyrosyl peptide interactions. *Cell* **76**, 821-828.

Shuai, K. (2000) Modulation of STAT signaling by STAT-interacting proteins. *Oncogene* **19**, 2638-2644.

Stark, G.R., Kerr, I.M., Williams, B.R., Silverman, R.H., Schreiber, R.D. (1998) How cells respond to interferons. *Annu. Rev. Biochem.*, **67**, 227-264.

Strehlow, I., Schindler, C. (1998) Amino-terminal signal transducer and activator of transcription (STAT) domains regulate nuclear translocation and STAT deactivation. *J Biol Chem* **273**, 28049-28056.

Van de Stolpe, A., Caldenhoven, E., Stade, B.G., Koenderman, L., Raaijmakers, J.A., Johnson, J.P., van der Saag, P.T. (1994) 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate- and tumor necrosis factor alpha-mediated induction of intercellular adhesion molecule-1 is inhibited by dexamethasone. Functional analysis of the human intercellular adhesion molecular-1 promoter. *J Biol Chem* **269**, 6185-6192.

Vairo, D., Tassone, L., Tabellini, G., Tamassia, N., Gasperini, S., Bazzoni, F., Plebani, A., Porta, F., Notarangelo, L.D., Parolini, S., Giliani, S., Badolato, R. (2011) Severe impairment of IFN- γ and IFN- α responses in cells of a patient with a novel STAT1 splicing mutation. *Blood* **118**, 1806-17

Vinkemeier, U., Cohen, S. L., Moarefi, I., Chait, B. T., Kuriyan, J. and Darnell, J. E., (1996) DNA binding of in vitro activated Stat1 alpha, Stat1 beta and truncated Stat1: interaction between NH2-terminal domains stabilizes binding of two dimers to tandem DNA sites. *EMBO J.* **15**, 5616-5626.

Wen, Z., Zhong, Z., Darnell, J.E. Jr. (1995) Maximal activation of transcription by Stat1 and Stat3 requires both tyrosine and serine phosphorylation. *Cell*, **82**, 241-250.

Wenta, N., Strauss, H., Meyer, S., Vinkemeier, U. (2008) Tyrosine phosphorylation regulates the partitioning of STAT1 between different dimer conformations. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 9238-43

Wesoly, J., Szweykowska-Kulinska, Z., Bluysen, H.A. (2007) STAT activation and differential complex formation dictate selectivity of interferon responses. *Acta Biochim Pol.* **54**, 27-38.

Xu, X., Sun, Y. L. and Hoey, T. (1996) Cooperative DNA binding and sequence-selective recognition conferred by the STAT amino-terminal domain. *Science* **273**, 794-797.

Yang, E., Wen, Z., Haspel, R. L., Zhang, J.J., Darnell, J.E. Jr. (1999) The linker domain of Stat1 is required for gamma interferon-driven transcription. *Mol Cell Biol* **19**, 5106-5112.

Yu, H., Pardoll, D., Jove, R. (2009) STATs in cancer inflammation and immunity: a leading role for STAT3. *Nat Rev Cancer*. **9**, 798-809.

Zakharova, N., Lymar, E.S., Yang, E., Malik, S., Zhang, J.J., Roeder, R.G., Darnell, J.E. Jr., (2003) Distinct transcriptional activation functions of STAT1alpha and STAT1beta on DNA and chromatin templates. *J Biol Chem*. **278**, 43067-73.

Zhang, T., Kee, W. H., Seow, K. T., Fung, W. and Cao, X. (2000) The coiled-coil domain of Stat3 is essential for its SH2 domain-mediated receptor binding and subsequent activation induced by epidermal growth factor and interleukin-6. *Mol. Cell Biol*. **20**, 7132-7139.

Zhang, Y., Jamaluddin, M., Wang, S., Tian, B., Garofalo, R.P., Casola, A., Brasier, A.R. (2003) Ribavirin treatment up-regulates antiviral gene expression via the interferon-stimulated response element in respiratory syncytial virus-infected epithelial cells. *J Virol*. **77**, 5933-47.

Verzeichnis akademischer Lehrer

Meine akademischen Lehrer in Marburg waren Damen und Herren:

Adamkiewicz	Aigner	Aumüller
Banzhoff	Barth	Bartsch
Basler	Bauer	Baum
Baumann	Becker	Berger
Bette	Bien	Bolm
Brehm	Cetin	Czubayko
Daut	Del Rey	Dietrich
Donner-Banzhoff	Eberhardt	Eickmann
Eilers	Fendrich	Feuser
Fritz	Geks	Gerdes
Glorius	Görg	Gress
Grimm	Grundmann	Grzeschik
Hasilik	Hegele	Hertl
Heverhagen	Höffken	Hofmann
Höglinger	Horn	Hoyer
Hundt	Kalinowski	Kann

Verzeichnis akademischer Lehrer

Kaufmann	Kerzel	Kill
Kim-Berger	Kircher	Klenk
Klingmüller	Klose	König
Koolman	Kortus-Götze	Kuhlmann
Leonhardt	Lill	Liss
Lohoff	Löffler	Maier
Maisch	Maisner	Mandrek
Meyer	Michl	Mittag
Moll	Moosdorf	Mueller
Müller	Mutters	Neubauer
Neumüller	Nimphius	Oertel
Olbert	Opitz	Pagenstecher
Plant	Printz	Ramaswamy
Rausch	Renz	Richter
Röhm	Röper	Rosenow
Rothmund	Ruchholtz	Schade
Schäfer	Schmidt	Schofer
Schrader	Schultze	Schütz
Seitz	Sekundo	Sönnichsen
Steinfeldt	Steiniger	Tackenberg
Teymoortash	Timmesfeld	Vogelmeyer

Verzeichnis akademischer Lehrer

Voigt	Wagner	Waldegger
Weihe	Werner	Westermann
Westhoff	Wiegand	Wrocklage
Wündisch	Wulff	Zwiorek

Danksagung

Ich möchte mich ganz besonders bei Herrn Prof. Dr. mult. Thomas Meyer für die Möglichkeit der Promotion unter seiner Leitung sowie für die umfangreiche Unterstützung bei der Vorbereitung und Durchführung dieser Arbeit bedanken.

Der Klinik für Innere Medizin mit dem Schwerpunkt Kardiologie unter der damaligen Leitung von Herrn Prof. Dr. Maisch bedanke ich mich für die Bereitstellung des Themas sowie des Arbeitsplatzes.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. Verena Koch und Frau Dr. Julia Staab für ihre ausführliche Einführung in die der Arbeit zugrunde liegenden Methoden sowie ihrer Hilfe und Unterstützung bei Fragen und Problemen.

Ich danke meiner Schwester Ronja sowie meinen Freunden und meiner Familie, die mich während des Studiums und der Dissertation stets motiviert und unterstützt haben.

Meiner Freundin Sarah bin ich dankbar, dafür dass sie mir immer zur Seite gestanden und viele konstruktive Vorschläge in die Arbeit eingebracht hat. Sie hat mich stets sowohl fachlich wie auch persönlich unterstützt und so zum Gelingen der Arbeit beigetragen.

Meinen Eltern Christel und Erwin Ziegler danke ich für ihre liebevolle Unterstützung. Sie haben mir die Durchführung meines Studiums und damit die Voraussetzung zur Promotion ermöglicht.